Studien zur Bestimmung der Immunglobulinspiegel am Beispiel normaler, gnotobiotischer und konventionalisierter Küken

Franz Gruber

1968

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. Johannes Brüggemann

STUDIEN ZUR BESTIMMUNG DER IMMUNGLOBULINSPIEGEL AM BEISPIEL NORMALER, GNOTOBIOTISCHER UND KONVENTIONALISIERTER KÜKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Franz Gruber

aus

Aschau im Chiemgau

München 1968

Mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. J. Brüggemann
Koreferent:	Prof. Dr. A. Mayr
Dekan:	Prof. Dr. J. Kalich

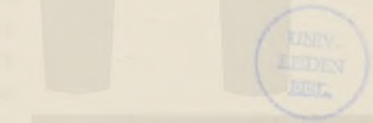
Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1968

"EXPRESS" Herbst & Co., München 2, Sendlingerstr. 58

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Übersicht über die Möglichkeiten zur quantitativen Immunglobulinbestimmung	1
2.1	Präzipitations-Reaktionen	5
2.2	Weitere Immunglobulinnachweisreaktionen	7
2.3	Elektrophorese	8
2.4	Immundiffusionen	9
3.	Selbst durchgeführte Methoden	19
3.1	Serum- und Antiserumgewinnung	19
3.2	Zweidimensionale Doppeldiffusion	21
3.3	Eindimensionale Immundiffusion	23
3.4	Einfache, radiale Immundiffusion	32
3.41	Material	32
3.42	Versuchsdurchführung	34
3.43	Versuchsauswertung	35
3.431	Beziehung zwischen Präzipitationsfläche, Zeit und Antigenkonzentration	38
3.432	Beziehung zwischen Antigenkonzentration und endgültiger Größe des Präzipitates	39
3.433	Beziehung zwischen Antiserumkonzentration und endgültiger Größe des Präzipitates	39
3.434	Reproduzierbarkeit der Methode	49
3.435	Empfindlichkeit der Methode	51
3.5	Diskussion der Methoden	54
4.	Quantitative Untersuchungen der Immunglobulinspiegel bei konventionellen, keimfreien und konventionalisierten Küken	56
4.1	Untersuchungen an konventionellen Tieren	56
4.2	Untersuchungen an keimfreien Tieren	61
4.3	Untersuchungen an konventionalisierten Küken	64
5.	Zusammenfassung	77
6.	Literaturverzeichnis	78
	Lebenslauf	85

Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41545802_0028

1. Einleitung

Die Träger der humoralen Abwehrstoffe der Wirbeltiere sind in der Serumfraktion der Gammaglobuline zu finden. Die Erforschung der als Immunglobuline bezeichneten Serumbestandteile führt zu einem in den letzten zwanzig Jahren sich ständig ausweitenden Zweig der Immunbiologie.
Aus der Vielzahl der Fragestellungen, die sich im Zusammenhang mit der Erforschung der Immunglobuline ergeben, sollen in der vorliegenden Arbeit zwei eng zueinander gehörende Aufgaben behandelt werden:

(1) Welche Möglichkeiten gibt es, die Immunglobuline des Huhnes spezifisch und quantitativ nachzuweisen?

(2) Welchen alters- und versuchsbedingten Verlauf der Immunglobulinspiegel zeigen normale (konventionelle), keimfreie (gnotobiotische) und dem keimfreien Milieu entnommene (konventionalisierte) Küken?

Die erste Aufgabe macht es notwendig, aus den verschiedensten gebräuchlichen Methoden eine geeignete auszuwählen und für die gegebenen Laborverhältnisse und Versuchsanforderungen zu modifizieren. Die zweite Aufgabe stellt praktisch ein Anwendungs- und Demonstrationsbeispiel für die gewählte Meßmethode dar, neben dem Anliegen, die quantitativen Immunglobulinspiegel der untersuchten Tiere möglichst genau zu kennen.

2. Übersicht über die Möglichkeiten zur quantitativen Immunglobulinbestimmung

Um den Gehalt spezifischer Immunglobuline in einem Serum zu bestimmen, sind die verschiedenen chemischen und physikalischen Proteinbestimmungsverfahren ungeeignet. Die Isolierung der zu messenden Proteine in Hunderten von Proben kleinster Quantität läßt sich praktisch nicht durchführen. Zudem unterscheiden sich biologisch sehr verschiedenartig wirksame Proteinstrukturen oft kaum in ihrer elementaren Zusammensetzung.
Die nötige Spezifität ist also ausschließlich solchen Methoden vorbehalten, die nur die zu messenden Proteine eines Proteingemisches quantitativ erfassen. Die spezifische Präzipitation, d.h. die Ausfällung eines Stoffes zusammen mit dem korrespondierenden Antikörper, stellt eine Methode höchster Spezifität dar. Auf diese Weise können sämtliche löslichen Antigene - im Rahmen dieser Arbeit die Immunglobuline des Huhnes - quantitativ bestimmt werden.
Zur Definition des Begriffes "Antigen" sei vorausgeschickt, daß als "Vollanti-

gene" alle natürlichen oder künstlichen Makromoleküle bezeichnet werden, die in der Lage sind, in Vertebraten die Bildung von Antikörpern zu induzieren und sich in vivo und in vitro mit diesen verbinden. Als "Haptene" bezeichnet man Stoffe, die sich lediglich mit Antikörpern verbinden, deren Bildung aber nicht induzieren können.
Weiter wird unterschieden zwischen korpuskulären und löslichen (molekularen) Antigenen, wovon die ersten vor allem die Bildung agglutinierender, die zweiten präzipitierende Antikörper induzieren. Die Antikörper, die spezifisch auf einen antigenen Reiz gebildet werden, kennzeichnet man üblicherweise nach den Reaktionen, die ihren Nachweis ermöglichen. So unterscheidet man zum Beispiel Präzipitine, Agglutinine, Opsonine, virusneutralisierende-, komplementbindende- und hämagglutinationshemmende Antikörper. Ein Antikörper kann mehrere dieser Charakteristika haben.

Zur Struktur der Antikörper liegt eine Vielzahl von zum Teil nicht ganz übereinstimmender Literatur vor. Sie beginnt mit frühen Untersuchungen von Deutsch u.a. (1) und Banovitz und Norton (2), die feststellen, daß Antikörper mit bestimmten, elektrophoretisch langsam wandernden Globulinen identisch sind, bis zu den heute gültigen Strukturvorstellungen von Porter (3) und Edelman (4). Im Aufbau - siehe Fig. 1 - muß man sich die Antikörper aus 2 x 2 jeweils identischen, tertiär strukturierten Proteinketten vorstellen, den zwei "leichten" (L) und den zwei "schweren" (H) Ketten; diese sind symmetrisch über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die antigenetische Determinante wird bestimmt durch verschiedenartige H-Ketten (γ -Kette beim γ -G- und μ Kette beim γ -M-Immunglobulin), die bei den Antikörpern des Huhnes zu den Bezeichnungen "IgG" und "IgM" führten, obwohl beim Vogel die H-Ketten-Determination experimentell noch nicht durchgeführt worden ist.

Beim Menschen und einigen anderen Vertebraten läßt sich noch eine dritte und vierte Determinante mit den Bezeichnungen α und δ ("IgA" und "IgD") feststellen. Ein in letzter Zeit entdecktes "IgE" ist noch nicht endgültig bestimmt. Da auch in der neuesten Literatur zum Teil noch die verschiedenartigsten Ausdrücke für ein und dasselbe Immunglobulin verwendet werden, sollen hier häufig vorkommende, synonyme Bezeichnungen für die wichtigsten Immunglobuline IgA, IgG und IgM zusammengefaßt werden.

IgA: γ_1A-, β_2A-Globulin,

6 - 13 S^+ γ-Globuline;

IgG: γG-, γ_2-, γ_{ss}-,

7 S^+ γ-Globulin;

IgM: γM-, γ_1M-, β_2M-,

19 S^+ γ-Globulin.

+ Aufgrund der Tatsache, daß die Immunglobuline sich in ihren Sedimentationskonstanten charakteristisch unterscheiden, werden auch diese für ihre Bezeichnungen verwendet. (IgA stellt ein Gemisch von Immunglobulinen mit verschiedenen Sedimentationskonstanten dar.)

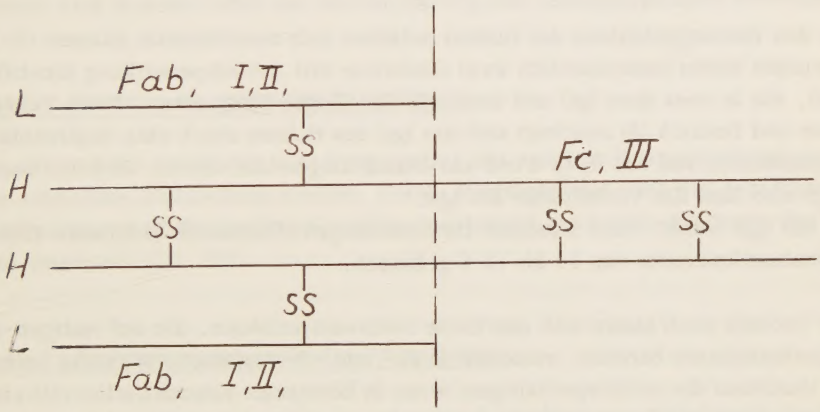


Fig. 1 Antikörperstruktur nach Porter (3).
Die gestrichelte Linie zeigt die Spaltung durch Papain.

Die Stellen des Antikörpermoleküls, an denen spezifisches Antigen gebunden werden kann, die "specific combining sites", sind an den H-Ketten des Fab-Stückes (I, II) zu finden. Die L-Ketten sind vermutlich an der Antigenbindung nur mit einer indirekten Hilfestellung beteiligt, indem sie den betreffenden Strukturabschnitt der H-Ketten schützen oder stabilisieren. Die experimentellen Untersuchungen, deren Ergebnisse zu diesen Aussagen führen, sind von Cohen und Porter in einer umfassenden Arbeit 1964 zusammengefaßt und diskutiert worden (5).
Aus der symmetrischen Struktur und aus Reaktionen, die mit Spaltungsprodukten angestellt werden, läßt sich weiterhin auf eine Bivalenz der Antikörper schließen.
Antikörper sind also Proteinmoleküle (= Immunglobuline) unverwechselbarer Struktur, die in verschiedenen Typen, entsprechend der Konfiguration der H-Ketten vorliegen.
Die Spezifität eines Antikörpers, zum Beispiel gegen Clostridium tetani, wird also allein durch die vom Antigen abhängige "specific combining site" geprägt, gleichgültig ob es sich bei dem Antikörper um ein Immunglobulin vom Typ IgA, IgG oder IgM handelt.

Mit den Immunglobulinen des Huhnes befaßten sich verschiedene Autoren (6-17). Es wurden bisher ausschließlich zwei Globuline mit Antikörperwirkung identifiziert, die in etwa dem IgG und dem IgM der Säuger entsprechen. Nach Tenenhouse und Deutsch (6) zeichnet sich das IgG des Huhnes durch eine Sedimentationskonstante von ca. 7, 73 S und ein Molekulargewicht von ca. 206 000 aus, zeigt also eher die Verhältnisse des IgA.
Für das IgM wurde nach neuesten Untersuchungen (Oberdorfer (18)) eine Sedimentationskonstante von 17 bis 18 S gefunden.

Der Technik nach lassen sich sämtliche Nachweisverfahren, die auf Antigen-Antikörperkomplexen beruhen, einteilen in α- und ß-Verfahren. Während beim α-Verfahren die antikörperhaltigen Seren in konstanter Konzentration mit einer Antigenverdünnungsreihe reagieren, bleibt beim ß-Verfahren die Antigen-Konzentration konstant und die Antikörper werden als Verdünnungsreihe verwendet.

Um - wie in der Aufgabenstellung gefordert - bestimmte Immunglobuline nachzuweisen, ist also die Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen diese Immunglobuline erforderlich, das ausschließlich Antikörper enthält, die mit dem zu messenden Immunglobulin einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden.
Zur Antiserumgewinnung werden Versuchstiere verwendet, denen die zu messende Proteinstruktur als Antigen eingespritzt wird, um die Bildung spezifischer Anti-

körper zu induzieren. Neben dem später beschriebenen Verfahren der eigenen Antiserumgewinnung sei hier auf einschlägige Stellen der Literatur verwiesen: Kabat (19), Coons u.a. (20), Goodman u.a. (21), Pressman (22).
Je nach Tierart, von der das Antiserum gewonnen wird, unterscheidet man grundsätzlich zwischen einem "Kaninchentypus" und einem "Pferdetypus". Der Unterschied ist bei der Erstellung der "Heidelbergerkurve" ersichtlich, die zeigt, daß maximale Präzipitation von Antigen-Antikörper-Komplexen innerhalb bestimmter Äquivalenzbereiche erfolgt; Kaninchenantiseren zeichnen sich gegenüber Pferdeantiseren durch wesentlich breitere Äquivalenzzonen aus (Cohn und Pappenheimer (23)).

2.1 Präzipitations-Reaktionen

2.11 Interfaciale (Ring-) Präzipitation

Im o -Verfahren werden Antigen und Antiserum in einem Röhrchen überschichtet. Der Endtiter der positiven Raktion liegt bei der Antigenverdünnung, die an der Berührungsfläche beider Substanzen noch eine Trübung zeigt. Dieses Verfahren wird in erster Linie zur Identifizierung von Eiweißsubstanzen verwendet (24).

2.12 Bestimmung optimaler Proportionen

Im α- oder ß-Verfahren wird festgestellt, bei welchen Konzentrationspaarungen die schnellste Ausflockung eintritt. Dieses Verfahren und auch die Bezeichnung Ausflockung statt Präzipitation werden vorwiegend bei Toxin-Antitoxin-Reaktionen verwendet (25, 26).

2.13 Bestimmung äquivalenter Proportionen

Antigen und Antikörper werden im α-oder ß-Verfahren vermischt und das Präzipitat abzentrifugiert. Die Hälfte des Überstandes wird darauf mit Antigen, die andere Hälfte mit Antikörperserum versetzt. Äquivalente Mengen von Antigen und Antikörper haben dann miteinander reagiert, wenn sich im Überstand mit beiden keine Präzipitation mehr ergibt (27).

2.14 Quantitative Präzipitationsreaktionen

2.141 Heidelberger-Verfahren

Im α -Verfahren läßt man Antigen und Antikörper miteinander reagieren. Das Präzipitat aus äquivalenten Proportionen beider Reagenten wird mit physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen und einer Proteinbestimmung unterzogen. Proteingehalt des Präzipitates minus dem bekannten Proteingehalt des Antigens ergibt die Gewichtsmenge der Antikörper (Heidelberger (28)).

2.142 Photometrisches Verfahren

Im Gegensatz zum experimentell aufwendigen Verfahren Heidelbergers (28), läßt man Antigen und Antikörper im -Verfahren bei hohen Verdünnungen beider Reaktionspartner reagieren. Die Antigen-Antikörper-Komplexe bilden nun kein ausfallendes Präzipitat, sondern führen zu einer Trübung der Lösung, die photometrisch auswertbar ist. Zu beachten ist, daß nur der aufsteigende Ast der aufgestellten Eichkurve verwertbar ist, da sich im Antigenüberschuß lösliche Reaktionsprodukte bilden (Boyden, Bolton und Gemeroy (29)).

2.143 Antigenmarkierung

Weiler u.a. (30) mit I-131 markiertem und Tengerdy (31) mit fluoreszierendem Antigen beschreiben eine Methode, die es erlaubt, mit Hilfe der I-131 Konzentration im Präzipitat bzw. der Fluoreszenzaktivität im Überstand auf die Immunglobulinkonzentration in einem Serum zu schließen Immunglobuline als Antigene werden in einen Antikörperüberschuß gebracht. Je nach ihrer Konzentration können sich daraufhin verschiedene Mengen von markiertem Antigen an der Präzipitation mit den verbliebenen Antikörpern beteiligen.

2.144 Immundiffusionen

Auf die Immundiffusion als qualitative und quantitative Bestimmungsmethode von Immunglobulinen wird in einem eigenen Kapitel nach dieser Übersicht besonders eingegangen.

2.2 Weitere Immunglobulinnachweisreaktionen

2.21 Immunagglutinationen

Die Immunagglutination (zu unterscheiden von der hämagglutinierenden Wirkung gewisser Viren, Bakterien und pflanzlicher Wirkstoffe) stellt eine Zusammenballung korpuskulärer Elemente von Antigeneigenschaft unter der Wirkung spezifischer Antikörper dar. Zu unterscheiden ist zwischen direkter und indirekter (passiver) Agglutination. Bei letzterer werden gelöste Antigene an sensibilisierte Erythrocyten oder Kolloidpartikel gebunden. Die passive Agglutination kann nicht nur zur Bestimmung der Antikörper, sondern auch der Antigene verwendet werden.

2.22 Komplementbindungsreaktionen

Das Komplement spielt bei der unspezifischen humoralen Immunität eine wichtige Rolle. Es setzt sich aus vier immunologisch gut identifizierbaren Faktoren zusammen, die sich in weitere Komponenten unterteilen lassen.

Versuchstechnisch versteht man unter Komplement frisches Serum von Meerschweinchen.
Der Titer des Komplements wird durch die komplementbedingte Hämolyse sensibilisierter Hammelerythrocyten bestimmt. Er ist abhängig von dem im Minimum anwesenden Komplementfaktor. Binden Antigen-Antikörper-Komplexe das Komplement - bleibt also die Hämolyse von zugesetzten Hammelerythrocyten aus - spricht man von einer direkten Komplementbindungsreaktion. Bei der indirekten Komplementbindungsreaktion werden dem zu untersuchenden Serum ebenfalls wieder Antigen und Komplement zugesetzt. Den Antigenverbrauch bestimmt man mit weiterer Zugabe komplementinaktivierenden Standard-Immunserums. War das Antigen bereits gebunden, wird kein Komplement inaktiviert, die zugesetzten Hammelerythrocyten zeigen Hämolyse.

Weitere Nachweismöglichkeiten bieten die Antiglobulinreaktionen (Coombs-Test), die Immunopsoninreaktionen, Reaktionen, die auf der Neutralisation der Antigenaktivität beruhen (hämagglutinationshemmende Antikörper), und die Koppelung der verschiedensten angeführten Reaktionen mit markiertem Antigen. Zusammenfassende Literatur über die in 2.22 angeführten Reaktionen finden sich u.a. bei Hitzig (32), Ackroyd (33) und Backhausz (34).

2.3 Elektrophorese

Bedingt durch die unterschiedlichen Masse-Ladungs-Quotienten, haben Proteinmoleküle verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrostatischen Feld. Da die amphoteren Proteinmoleküle sich sowohl als Kationen als auch als Anionen verhalten können, spielt für die Wanderungsgeschwindigkeit und -richtung außer der Molekülgröße und -ladung und der angelegten Spannung, der p_H-Wert des Mediums eine entscheidende Rolle. Die Möglichkeit der Erfassung spezifischer Immunglobuline besteht nicht; es können lediglich gemeinsam im Gammaglobulinbereich wandernde Plasmaproteine zusammen quantitativ erfaßt werden. Zu unterscheiden ist zwischen der freien Elektrophorese und der Elektrophorese auf Trägermedien.

2.31 Freie Elektrophorese

Ausgehend von der Methode nach Tiselius (35) wurden einfachere Modifikationen von Antweiler (36) und Labhart und Straub (37) entwickelt. Bei allen freien Elektrophoresen wird die Spannung an eine Pufferlösung mit darin gelösten Proteinen angelegt und die Proteinverteilung nach der Wanderung meist photometrisch bestimmt.

2.32 Elektrophorese auf Trägermedien

Weitaus gebräuchlicher als die freie Elektrophorese sind, der einfacheren und billigeren Anwendung wegen, die Papierelektrophorese, die Stärkeblockelektrophorese, die Elektrophorese auf Cellulose-Azetatfolie und im Agargel. Besonders die letzte Modifikation wurde durch die Weiterentwicklung zur Immunelektrophorese zu einem wichtigen Instrument der Immunbiologie.

2.33 Immunelektrophorese

Grabar und Williams (38) beschreiben erstmals die Immunelektrophorese, Scheidegger (39) modifiziert sie zur Mikroimmunelektrophorese. Zwei aufeinanderfolgende physikalische Prinzipien werden zur Auftrennung der Serumproteine benützt: Nach der Elektrophorese im Agargel diffundiert senkrecht zur Achse der Wanderungsrichtung der Serumproteine poly- oder monovalentes Antiserum und bildet so mit allen oder einzelnen Fraktionen ein charakteristisches, bogenförmiges Präzipitat. Durch immunchemische, physikochemische, färberische und enzymatische Methoden lassen sich die einzelnen Präzipitate

identifizieren. Die Immunelektrophorese ist als absolut spezifisch anzusehen, kann jedoch nur zu semiquantitativen Schätzverfahren herangezogen werden.

2.34 Elektroimmundiffusion

Bessere quantitative Ergebnisse lassen sich mit einer Modifikation der Immunelektrophorese nach Laurell (40) erzielen. Das zu untersuchende Antigen wird elektrophoretisch in einem bereits antiserumhaltigen Agargel aufgetrennt. Die Länge der sich ergebenden spitzbogenförmigen (bei schneller elektrophoretischer Wanderung) bzw. rundbogigen (bei langsam wandernden Antigenen) Präzipitate dient als Maßstab für die Antigenkonzentration (41.42). Die Standardisierung des Versuches ist aufwendiger als bei den unten beschriebenen reinen Diffusionsmethoden, als Vorteil gilt die kurze Versuchsdauer (2 bis 3 Std.).

2.4 Immundiffusionen

Das Prinzip aller Immundiffusionen beruht darauf, daß Antigen und Antikörper in einer Agargelschicht bzw. -säule eine sichtbare Präzipitation bilden. Zur genauen mathematisch-physikalischen Ableitung der Diffusionsgesetze sei auf Backhausz (43) verwiesen. Im wesentlichen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls in einem Diffusionsmedium von seinem Diffusionskoeffizienten ab. Dieser ist umso größer, je kleiner der Molekülradius, je geringer die Viskositätskonstante des Mediums und je höher die Temperatur ist.

2.41 Doppelte zweidimensionale Immundiffusion nach Ouchterlony (44)

Am einfachsten läßt sich die Immundiffusion mit der Rosettenanordnung nach Ouchterlony (44) durchführen. In einer Petrischale wird Agargel ausgegossen. In das erstarrte Gel werden, wie Fig. 2 zeigt, rosettenartig Löcher eingestanzt. Antiserum (meist vom Zentrum) und Antigen (meist von der Peripherie) diffundieren nun aufeinander zu und bilden Präzipitationslinien. Zusammengehörige Antiserum- und Antigen-Moleküle bilden ihr Präzipitat immer in einer einzigen Linie. Aus der Relation der einzelnen Linien lassen sich zudem wertvolle Rückschlüsse auf die Verwandtschaftsbeziehungen einzelner Antigene ziehen. In Fig. 2 diffundiert vom Zentrum aus ein Antiserumgemisch, bestehend aus Anti-A und Anti-B (Anti-AB). Von der Peripherie her diffundieren folgende Antigene:

1) Antigen A und
2) Antigen B
3) ein Gemisch aus A und B (A + B)
4) Antigen A' und
5) Antigen B', also Varianten von A und B
6) ein Gemisch aus A' und B' (A' + B')

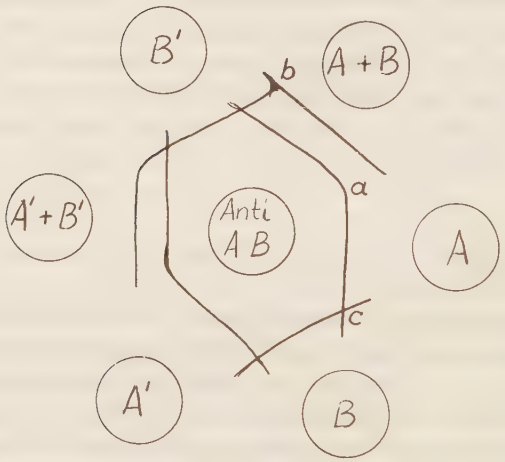


Fig. 2 Beispiel einer zweidimensionalen, doppelten Immundiffusion

Treffen, wie bei a (Fig. 2), zwei völlig identische Antigen-Antikörper-Präzipitationslinien zusammen, so gehen sie fugenlos ineinander über. Sind beide Präzipitationslinien nicht völlig identisch, sondern bestehen nur gemeinsame Antigendeterminanten wie in Fig. 2 bei b, bei Antigen B und B', so kommt es zur Ausbildung eines sogenannten "Sporns". Besteht schließlich keinerlei Verwandtschaftsbeziehung zwischen zwei Antigenen, wie z.B. in Fig 2 bei c, zwischen Antigen A und Antigen B, so schneiden sich die Präzipitationslinien.
Während über die Spezifität des Versuches bei geeigneter Anordnung keine Zweifel bestehen, müssen ganz besondere Variationen in der Konzentration und Menge der eingefüllten Seren und Antiseren benützt werden, um genauere quantitative Ergebnisse zu erhalten.

Zu unterscheiden ist dabei zwischen dem Verfahren der Endpunktsbestimmung, d.h. gemessen wird der Endtiter bei dem noch eine Präzipitation sichtbar wird, und dem visuellen Vergleich der Intensität oder Ausprägung der Präzipitationslinien bei bekannten Antiserumkonzentrationen. Endpunktsbestimmungen beschreiben Darcy (45) und Sharpless (46), während die Technik des visuellen Vergleichs von Gell (47), Hayward (48) und vielen anderen eingehend geschildert wird.

2.42 Anguläre Doppeldiffusion

Schließen zwei geradwandige Antigen- bzw. Antikörperbehälter einen Winkel ein, der kleiner als 180° ist, und begegnen sich beide Reaktionspartner, die parallel zu den Grenzflächen diffundieren, in einem Gel, das ursprünglich keinen der Reaktionspartner enthält, so spricht man von linearer, angulärer Doppeldiffusion. Die anguläre Diffusion läßt sich beliebig modifizieren, je nachdem, in welcher Entfernung die Behälter voneinander stehen und welchen Winkel sie einschließen. Mit der angulären Diffusion lassen sich außer auf die Konzentration, über den vom Winkel der Präzipitatlinie abhängigen Diffusionskoeffizienten, auch auf das Molekulargewicht eines Reaktionspartners Rückschlüsse ziehen (49, 50).

2.43 Prädiffusion nach Feinberg

Feinberg (51) beschreibt eine Modifikation der Ouchterlonyanordnung, bei der das Antiserum zeitlich wesentlich früher in den Agar diffundiert als das Antigen (Prädiffusion). Als Endpunkt der Antigenverdünnung dient diejenige Konzentration, bei der sich eben noch eine ringförmige Präzipitation um die Antigenauftragstelle bildet.

2.44 Eindimensionale Immundiffusion

Durch eindimensionale Anordnung läßt sich die Immundiffusion wesentlich empfindlicher durchführen, da der quadratische Verdünnungseffekt der radialen zweidimensionalen Diffusion entfällt.
Die Diffusion wird dabei in ein Röhrchen verlegt, beide Diffusionspartner wandern in einer schmalen Agarsäule aufeinander zu und bilden einen Präzipitationsring, der je nach der Konzentration von Antigen und Antiserum unterschiedliche Entfernung vom Ausgangspunkt der Migration erkennen läßt (Fig. 3).

Fig. 3 Fig. 4

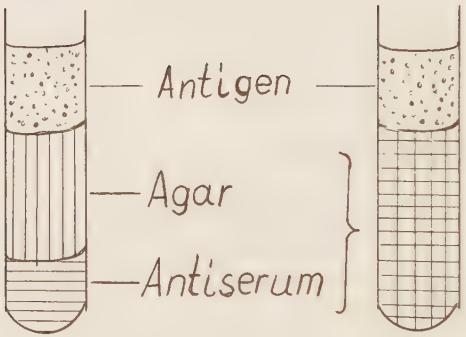


Fig. 3 und 4 Eindimensionale Immundiffusion

Oudin (52) führt diese Methode mit einer weiteren Abänderung durch: Einer der beiden Reaktionspartner, meist das Antiserum, wird von vorneherein in das Agargel inkorporiert (siehe Fig. 4). Das eindiffundierende Antigen bildet eine Präzipitationssäule, deren Länge proportional der Zeit ist:

$$h = k \cdot \sqrt{t}$$

h = Länge der Präzipitationssäule
k = Konstante bei gleichbleibender Versuchsanordnung
t = Zeit

Weiter besteht Proportionalität zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit des Antigens und dem Logarithmus seiner Konzentration:

$$\log C_{Ag} = b + a \frac{h}{\sqrt{t}}$$

C_{Ag} = Antigenkonzentration ; a und b sind vom jeweiligen Antigen-Antikörper-System abhängige Konstanten.

Endlich ist die Länge der Präzipitationssäule auch noch umgekehrt proportional der Antiserumkonzentration im Agar. Der wesentlichste Unterschied zur unten beschriebenen einfachen, radialen Immundiffusion besteht darin, daß nur die Antigenkonzentration, nicht aber die absolute Antigenmenge das Ergebnis bestimmt. Die Antigenmenge muß also nicht genau dosiert einpipettiert werden. Ebenfalls im Unterschied zur radialen Immundiffusion muß auf strengste Temperaturkonstanz während der Diffusion und genau gleiche Diffusionszeiten geachtet werden.

2.45 Einfache, radiale Immundiffusion

Bereits 1932 beobachtet Petrie (53), daß Bakterienkolonien, die auf einem spezifisches Antiserum enthaltenden Nährboden wachsen, von ringförmigen Präzipitationslinien umgeben sind.
Ouchterlony (54) benützt diese Erscheinung erstmals zu einem semiquantitativen Test, um die Toxinbildung verschiedener Corynebacteriumstämme zu messen. Er macht die Beobachtung, daß der Durchmesser der Präzipitationsringe proportional der Menge des von den Kulturen gebildeten Antigens und umgekehrt proportional der Konzentration des Antiserums im Nährboden ist.
Feinberg (55), Hayward und Augustin (56) und Crowle (57) beschreiben 1957 und 1960 eine Modifikation der einfachen, radialen Diffusion, bei der die Endpunktsbestimmung als Meßgrundlage dient. Feinberg (58, 59) führt diese Methode auch auf antiserumgetränkter Cellulose-Acetat-Folie durch.
Mancini u.a. (60) weisen dann 1964 nach, daß eine lineare Beziehung zwischen der Präzipitatfläche und der Antigenkonzentration besteht, wenn man die Diffusion so lange fortschreiten läßt, bis alles Antigen im Antiserum gebunden ist.
1965 endlich beschreiben Mancini, Carbonara und Heremans (61) eingehend eine spezifische, quantitative Meßtechnik, die auf einfacher, radialer Diffusion beruht:
In Agargel inkorporiertes Antiserum wird zwischen zwei völlig plane Glasplatten gefüllt, von denen eine silikoniert ist. Der gleichmäßige Abstand der Glasplatten von 1 mm und die Abdichtung werden durch einen Messingrahmen gewährleistet. Nach dem Erstarren des Gels werden die silikonierte Glasplatte entfernt und Löcher von 2 mm Durchmesser zur Aufnahme des Antigens eingestanzt. Je 2 mcl (mcl = μl) der zu untersuchenden Seren werden mit Hilfe einer Mikroliterspritze in die Löcher eingefüllt. In streng horizontaler Lage kommt die Platte solange in eine feuchte Kammer (10 - 30 Min.), bis das Antigen vom Gel aufgesaugt ist. Anschließend wird die Platte unter eine 2 cm dicke Schicht Paraffinöl mit Thymolzusatz verbracht. Nach mehreren Tagen

Diffusion, wenn zu erwarten ist, daß sämtliches Antigen mit dem Antiserum präzipitiert hat, wird die Platte aus dem Ölbad genommen und das anhaftende Öl mit Petroläther entfernt. Die Silhouetten der kreisförmigen Präzipitationen werden auf starkes Papier projiziert, aufgezeichnet, ausgeschnitten und gewogen. Schwächere Präzipitationen werden vorher mit Amidoschwarz angefärbt. Da in einigen Versuchen hauptsächlich mit einer Modifikation der Technik nach Mancini gearbeitet wird, soll im Folgenden ausführlich auf Mancinis Standardisierungsversuche eingegangen werden.

2.451 Wachstum der Präzipitation als Funktion der Zeit (61)

Im Gegensatz zur Oudin-Technik ist die Zunahme der Präzipitation nur in der frühesten Diffusionsperiode der Quadratwurzel der Zeit proportional.

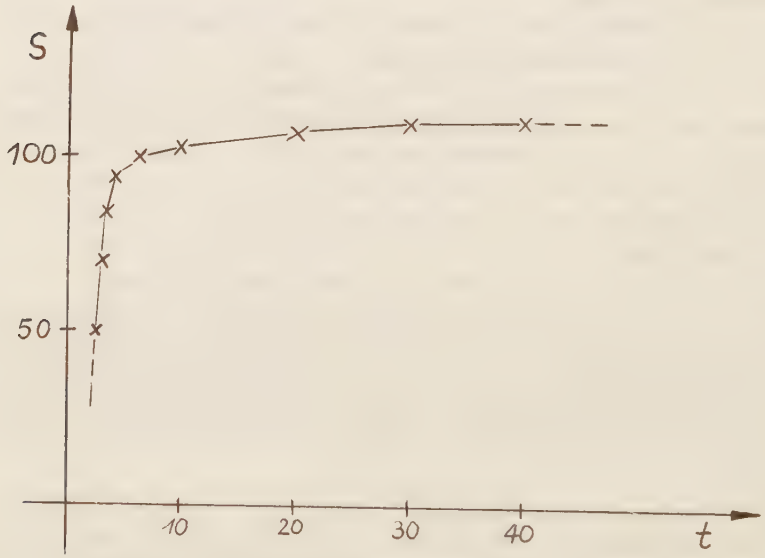


Fig. 5 Einfluß der Zeit auf die Präzipitation

S = Fläche des Präzipitates im mg Papiergewicht
t = Zeit in Stunden

Diese Art des Kurvenwachstums gilt für alle untersuchten Antigen-Antiserum-Systeme. Unterschiede bei verschiedenen Systemen können sich ergeben in der Zeit, die benötigt wird, um die endgültige Größe der Präzipitation zu erreichen.

2.452 Beziehung zwischen Antigenkonzentration und endgültiger Größe des Präzipitates (61)

Zwei Beziehungen werden gefunden: (1) Die Antigenkonzentration steht in einem direkten Verhältnis zur Zeit, die zum Erreichen der größten Präzipitation nötig ist. (2) Es besteht eine lineare Beziehung zwischen Antigenkonzentration und der Fläche des Präzipitates am Ende der Diffusion:

$$S = S_o + K \cdot Q_{Ag}$$

S = Fläche des Präzipitates am Ende der Diffusion im mg Papiergewicht
S_o = Extrapolation der Kurve zurück auf den Nullpunkt der Antigenkonzentration
K = Konstante bei gleichbleibender Antiserumkonzentration
Q_{Ag} = Konzentration des Antigens

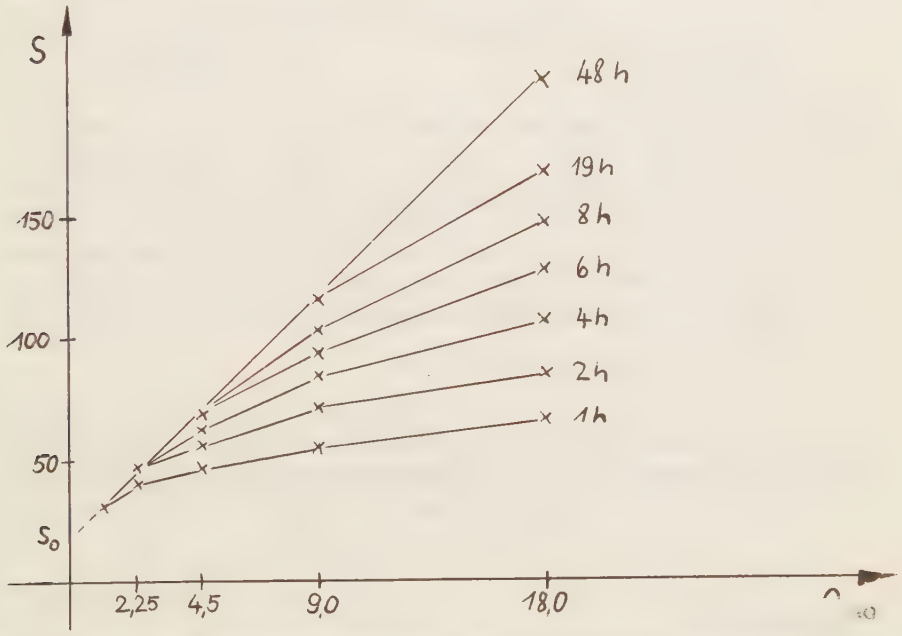


Fig. 6 Einfluß von Antigenkonzentration und Zeit auf die Präzipitation

S = Fläche des Präzipitates in mg Papiergewicht
S_o = Extrapolation der Kurve zurück auf den Nullpunkt der Antigenkonzentration
Q_{Ag} = Antigenkonzentration in mg/ml

2.453 Beziehung zwischen Antiserumkonzentration und engültiger Größe des Präzipitates (61)

Vier verschiedene Konzentrationen menschlichen Serumalbumins diffundieren in je drei verschiedene Konzentrationen von Kaninchenantiserum.

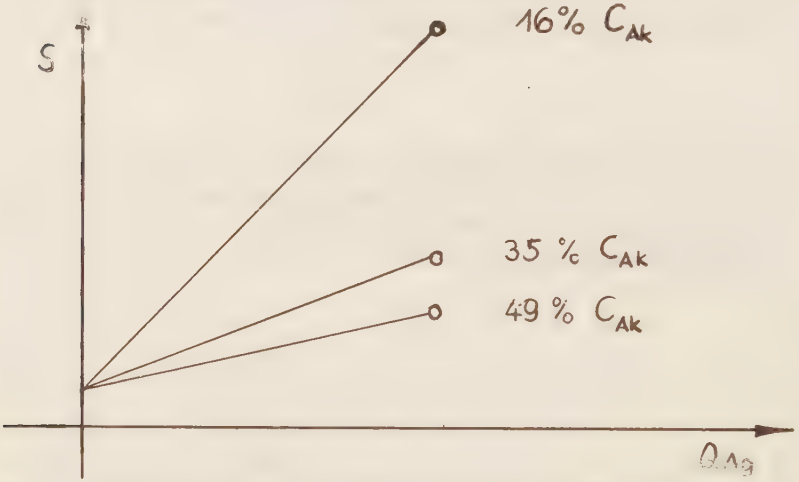


Fig. 7 Einfluß der Antiserumkonzentration auf die Präzipitation

S = Fläche des Präzipitates am Ende der Diffusion in mg Papiergewicht

Q_{Ag} = Antigenkonzentration in mg/ml

C_{Ak} = Antiserumkonzentration

Der in Fig. 7 gezeigte Einfluß der Antiserumkonzentration auf die Steigung der Kurve bei wachsenden Antigenkonzentrationen wird durch die Formel

$$K = m + n \frac{1}{C_{Ak}}$$

ausgedrückt.

K = von der Antiserumkonzentration abhängige Konstante in der Formel $S = S_o + K \cdot Q_{Ag}$

C_{Ak} = Antiserumkonzentrationen

m und n sind Konstanten bei gleichbleibenden Versuchsanordnungen.

2.454 Reproduzierbarkeit der Methode (61)

In vier Platten mit verschieden dicken Agar-Antiserum-Schichten werden in je vier Quadranten 16 Antigenlöcher eingestanzt. Antiserum- und Antigenkonzentration werden für alle 64 Proben ebenso wie die Menge des eingefüllten Antigens beibehalten.
Die statistische Analyse der Ergebnisse sagt aus:
(1) Von einer Platte zur anderen bestehen Variationen, die auf verschiedene Schichtdicken zurückzuführen sind.
(2) Die Variationen der Werte innerhalb einzelner Quadranten sind nicht signifikant.
(3) Der experimentelle Fehler, ausgedrückt als Standardabweichung vom Mittel, beträgt 1,7 %, die Standardabweichung aller 64 Proben beträgt 2 %.

2.455 Der Einfluß von Temperaturunterschieden auf die endgültige Größe der Präzipitation (61)

Drei identische Platten werden bei verschiedenen Temperaturen angesetzt. Die Präzipitationen werden während der Diffusion wiederholt auf ihre Größe geschätzt. Es zeigt sich, daß die korrespondierenden Präzipitationen mit dem größten Antigengehalt ihre Endgröße in acht Tagen bei + 37 ^{o} C, in 10 Tagen bei + 21 ^{o} C und in 14 Tagen bei + 4 ^{o} C erreichen.
Diese Werte können bei anderen Antigen-Antikörper-Komplexen variieren. Auf die Endgröße der Präzipitation haben verschiedene Temperaturen keinen Einfluß.

2.456 Empfindlichkeit der Methode

Platten mit 1/10, 1/50 und 1/100 Antiserumverdünnung werden mit je acht verschiedenen Antigenmengen plus konstanter Flüssigkeitsmenge angesetzt.

Tabelle 1 :

Antiserumkonzentration	Antigenkonzentration
1/10	0,1 - 1,28 mcg
1/50	0,005 - 0,64 mcg
1/100	0,0025 - 0,32 mcg

Es zeigt sich, daß die untere Nachweisgrenze für das verwendete Antigen bei 1/100 Antiserumverdünnung 0,0025 mcg beträgt.

Aus der gegebenen Übersicht der Möglichkeiten zur Immunglobulinbestimmung werden drei Methoden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

(1) Die Bestimmung soll absolut spezifisch sein,
(2) sie soll ein Höchstmaß an Reproduzierbarkeit biefen,
(3) sie soll (im Hinblick auf zu messende niedrige Immunglobulinspiegel keimfreier Tiere) einen möglichst niederen unteren Erfaßbarkeitsbereich aufweisen,
(4) sie soll mit vorhandenem Laborgerät durchgeführt werden können.

Hierzu kommen in Betracht:

Die Immundiffusionen

(1) nach Ouchterlony
(2) nach Oudin
(3) nach Mancini, Carbonara und Heremans.

Sie müssen zur Durchführbarkeit mit der vorhandenen Laborausrüstung modifiziert werden.

Im folgenden Kapitel 3 sollen die Erfahrungen mit diesen Methoden dargestellt werden, wobei die Betonung auf das letztere Verfahren (nach Mancini) gelegt wird, da es sich nach relativ kurzer Zeit als das geeignetste erweist.

Im Kapitel 4 werden darauf die grundlegenden Verhältnisse der Immunglobulinspiegel bei keimfreien, gnotobiotischen und konventionalisierten Küken gezeigt, um ein Beispiel für die praktische Anwendung des ausgewählten Bestimmungsverfahrens zu geben.

Weiter wird mit diesen Versuchen das Ziel verfolgt, einen Beitrag zur Diskussion zu liefern, inwieweit man von "normalen" Immunglobulinspiegeln bei konventionellen Tieren sprechen kann, wie keimfreie Tiere in dieser Hinsicht auf die besonderen Haltungsbedingungen reagieren und in welcher Zeitspanne konventionalisierte Küken sich "normalen" Tieren anpassen.

3. Selbst durchgeführte Methoden

3.1 Serum- und Antiserumgewinnung

3.11 Serumgewinnung

Blut der zu untersuchenden Tiere wird aus der Flügelvene mit innen geschliffenen Kanülen entnommen und in Glasröhrchen abgefüllt. Der sich ansetzende Blutkuchen wird von der Glaswand abgelöst und das Blut so einen Tag bei ca. + 4 °C aufbewahrt. Darauf wird das Serum dekantiert und sofort tiefgefroren. Bei Küken unter 30 Tagen Lebensalter wird das Blut durch Herzpunktion gewonnen. Bei einwandfreier Technik überleben einige Tiere auch mehrere Punktionen in den ersten 10 Lebenstagen.
Als Standardseren werden Sammelproben großer Tierzahlen vom Geflügelschlachthof - getrennt nach Broilern (BS) und Leghorn (LS) - verwendet. Als spezieller Vergleichsstandard für IgG[+] wird durch kombinierte Rivanol-Natriumsulfatfällungen (62, 63, 64) einprozentiges IgG hergestellt. Ein direkter Standard für IgM[+] liegt in der nötigen Reinheit noch nicht vor. Alle IgM-Werte werden daher in Prozent auf das Vollserum der oben erwähnten Sammelseren bezogen (100 % = IgM-Gehalt eines Serumpools von 120 acht Wochen alten Mastküken).

3.12 Antiserumgewinnung

Vier Kaninchen werden wöchentlich je 1 ml auf 1 % Protein verdünntes Hühnerserum injiziert. Die erste Injektion wird zusammen mit der gleichen Menge Freunds Adjuvans[x] subcutan in die Zwischenzehenfalten und die Regionen der axillaren und inguinalen Lymphknoten verabreicht. Weitere 6 bis 10 Injektionen (ohne Freunds Adjuvans) werden intravenös vorgenommen.
Das so gewonnene polyvalente Antiserum wird stufenweise zu spezifischen Antiseren abgesättigt. Um Antiserum gegen IgG des Huhnes zu gewinnen, werden zur Absättigung Seren dysgammaglobulinämischer (65) und keimfreier Tiere verwendet.

Als Beispiel seien zwei Absättigungsschemen angegeben, die sich nach verschiedenen Versuchsreihen als vorteilhaft erwiesen:

[+] Definition von Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) siehe S. 2

[x] Kombinationspräparat der Firma Difco. Lab., bestehend aus Mineralöl, Lanolin und apathogenen Mycobakterien.

$$AS\ (IgG) = aAs + a\frac{9}{10}\ Gf + a\frac{3}{10}\ Dys$$

$$AS\ (IgM) = aAs + \frac{a}{2}\ Ein$$

AS (IgG) = monovalentes Antiserum gegen IgG
AS = polyvalentes Antiserum
a = Gesamtmenge an polyvalentem Antiserum
Gf = Serum keimfreier Tiere
Dys = Serum von dysgammaglobulinämischen Tieren (65)
AS (IgM) = monovalentes Antiserum gegen IgM
Ein = Serum männlicher Küken unter 24 h Lebensalter

Zur Absättigung von monovalentem Antiserum gegen IgM werden Seren von Eintagsküken verwendet.
Manchmal auftretende Verunreinigungen[+] können durch weitere Absättigung mit Seren älterer keimfreier Tiere eliminiert werden.
Sämtliche monovalente Antiseren werden gegen Gesamtseren erwachsener Tiere in der Immunelektrophorese und in der Immundiffusion nach Ouchterlony geprüft.
Die Immundiffusion zeigt sich dabei als wesentlich empfindlicher. Immunelektrophoretisch monovalente Antiseren können in der Immundiffusion noch Verunreinigungen zeigen.
Die so hergestellten monovalenten Antiseren werden in Plastikschläuche bekannten Innendurchmessers (je nach vorhandener Menge 1 - 10 mm) abgefüllt und bei -15°C tiefgefroren. Kurz vor jedem Versuch wird die gewünschte Antiserum menge (auszurechnen in cm-Länge des Plastikschlauches) im Tiefkühlkeller abgeschnitten und langsam aufgetaut.
Diese Methode hat den Vorteil, daß die Antiseren nur einmal tiefgefroren und nicht größere Mengen als benötigt wieder aufgetaut werden müssen. So behandeltes Antiserum läßt auch nach zwei Jahren noch keinen Titerabfall an spezifischen Antikörpern erkennen.

[+] Als Verunreinigung wird jede nicht für IgG bzw. IgM spezifische Präzipitation bezeichnet.

3.2 Zweidimensionale Doppeldiffusion

3.21 Material

(1) Geschliffene Objektträger von LKB[+]
(2) Stanzen (siehe Fig. 8) und Rahmen für je sechs Objektträger von LKB[+]
(3) Phosphatgepufferte Agarose folgender Zusammensetzung:

0,58 g NaCl
0,52 g KH_2PO_4 · $2H_2O$
ad 100 ml aqua dest.
mit n/10 NaOH auf p_H 8,0 einstellen
2 g Agarose[++] auf 100 ml obigen Puffers
0,1 g Thiocid[+++] -Zusatz (= 1:1000)

3.22 Versuchsdurchführung

Gereinigte und entfettete Objektträger werden durch kurzes Eintauchen in heisse 0,2 %ige Agarose und anschließendes Trocknen bei +90° C mit Agar beschichtet. Nach dem Antrocknen des Agarfilms werden je 6 Objektträger auf einen horizontalen Rahmen gelegt und die Fugen mit ca. 3 %iger Agarose ausgegossen. Ist diese erstarrt, werden die überstehenden Agarreste mit einem Spatel entfernt. Nun wird der eigentliche Diffusionsagar - die angegebene 2 %ige Agarose - gleichmäßig über den gesamten Rahmen pipettiert. Pro Rahmen werden 25 ml verwendet, was einer Schichtdicke der Agarose von ca. 1,8 mm entspricht.
Nach dem Erstarren des Gels werden mit der LKB-Stanze Löcher eingestanzt und die Agarzylinder mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen, abgeschliffenen Injektionskanüle ausgehoben. Die Muster der LKB-Stanzen zeigt Fig. 8.

[+] LKB-Produkter AB, Stockholm

[++] Agarose, reinst, SO_4H-Gruppen $< 0,03$ m Val/g
CO_3H-Gruppen $< 0,2$ m Val/g
Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg

[+++] Thiocid: P-(Aethyl-mercuri-mercapato)-benzolsulfonsaures Natrium, Firma ASID-Institut GmbH, München-Lohof

Zu untersuchende Seren als Verdünnungsreihen[+] und Standardverdünnungsreihen werden abwechselnd reihum mit feinausgezogenen Mikropipetten eingefüllt. Als Antiserumverdünnung wird eine den Antigenverdünnungen entsprechende Konzentration in das zentrale Loch eingefüllt. Alle Löcher werden eben aufgefüllt. In horizontaler Lage kommen die Rahmen mit den Objektträgern in eine feuchte Kammer.

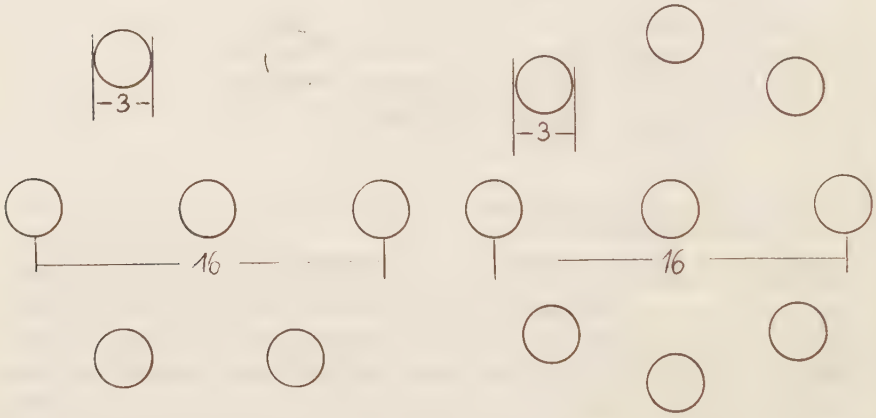


Fig. 8 Rosettenmuster zur zweidimensionalen Doppeldiffusion (LKB-Stanzen). Je zwei dieser Rosetten passen auf einen Objektträger. Maße in mm.

3.23 Versuchsauswertung

Nach 24 Stunden Diffusionszeit wird der Versuch nach dem Prinzip der Endpunktsbestimmung (s. 2.41) ausgewertet. Verglichen werden also diejenigen

---

[+] alle Serum- und Antiserumverdünnungen werden grundsätzlich mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung vorgenommen.
Zusammensetzung: 0,8 g NaCl
0,156 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ad 100 ml aqua dest. mit n/1 NaOH auf pH 8,0 einstellen

Konzentrationen, die eine eben noch sichtbare Präzipitationslinie mit dem Antiserum ergeben.

Als Beispiel:

Das Serum eines keimfrei gehaltenen Tieres (A) wird mit einem IgG Standard (unverdünnt 1000 mg % IgG enthaltend) verglichen.
Die letzten ablesbaren Präzipitationslinien ergeben sich bei 1/8 bzw. 1/512 der Ausgangskonzentrationen.

Also gilt: $\frac{A}{8}$ entspricht $\frac{IgG}{512}$

Demnach beträgt die IgG-Konzentration im Serum des Kükens A in etwa

$$\frac{8 \cdot 1000}{512} = 15,6 \text{ (mg \%)}$$

Dieses Schätzverfahren wird lediglich zur Ermittlung des Größenbereiches verwendet, in dem die genaue IgG- oder IgM-Konzentration zu suchen ist.

3.3 Eindimensionale Immundiffusion nach Oudin

3.31 Material

(1) Pyrex-Glasröhrchen von 60 mm Länge und 2 mm Innendurchmesser
(2) Agar-Antiserum-Gemisch:
Zweiprozentige, phosphatgepufferte Agarose (wie bei 3.21) wird vom Sieden auf + 60°C abgekühlt.
Die gewünschte Antiserumverdünnung (jeweils die doppelte Konzentration der am Ende bestehenden Antiserumverdünnung) wird auf + 55°C erwärmt und mit der Agarose im Verhältnis 1:1 vermischt.

3.32 Versuchsdurchführung

Die Glasröhrchen werden durch kurzes Eintauchen in heiße, 0,2 %ige Agarlösung und anschließendes Trocknen bei + 90° C mit einem Agarfilm ausgekleidet. In waagrechter Lage der auf ca. + 50° C abgekühlten Röhrchen werden mit einer Rekordspritze und abgeschliffenen Kanülen 20 bis 30 mm lange Säulen des Anti-

serum-Agargemisches eingefüllt und die Röhrchen bis zum Erstarren der Säulen in der waagrechten Lage belassen. Auf die Antiserum-Agarsäulen werden sodann vorsichtig - ohne den Meniskus der Säulen zu verletzen - die Antigenverdünnungen in einer Höhe von ca. 10 mm aufgeschichtet. Durch kurzes Eintauchen in flüssiges Paraffin werden die Röhrchen an beiden Seiten verschlossen und in streng vertikaler Lage bei möglichst konstanter Zimmertemperatur belassen.

3.33 Versuchsauswertung

Nach genau einzuhaltender, konstanter Diffusionszeit werden mit einer Mikrometerschraube die Längen der in jedem Röhrchen entstandenen Präzipitationssäulen auf 1/20 mm genau abgelesen. Die erhaltenen Werte (siehe Tabelle 2) werden auf halblogarithmisches Papier aufgetragen (siehe Fig. 9). Zur Auswertung wird eine zur Abszisse parallele Hilfslinie gezogen, die die Standard- und Testserenkurven bei Konzentrationen schneidet, die gleichlangen Agarsäulen entsprechen.

Rechnungsbeispiel nach Fig. 9 :

$$\frac{Gf}{1} \approx \frac{IgG}{6,7} \approx \frac{Ko}{17,3} \approx \frac{LS}{28,5}$$

$$Gf \approx \frac{300}{6,7} \approx 44,8 \text{ (mg \%)}$$

$$Ko \approx \frac{17,3 \cdot 300}{6,7} \approx 774 \text{ (mg \%)}$$

$$LS \approx \frac{28,5 \cdot 300}{6,7} \approx 1275 \text{ (mg \%)}$$

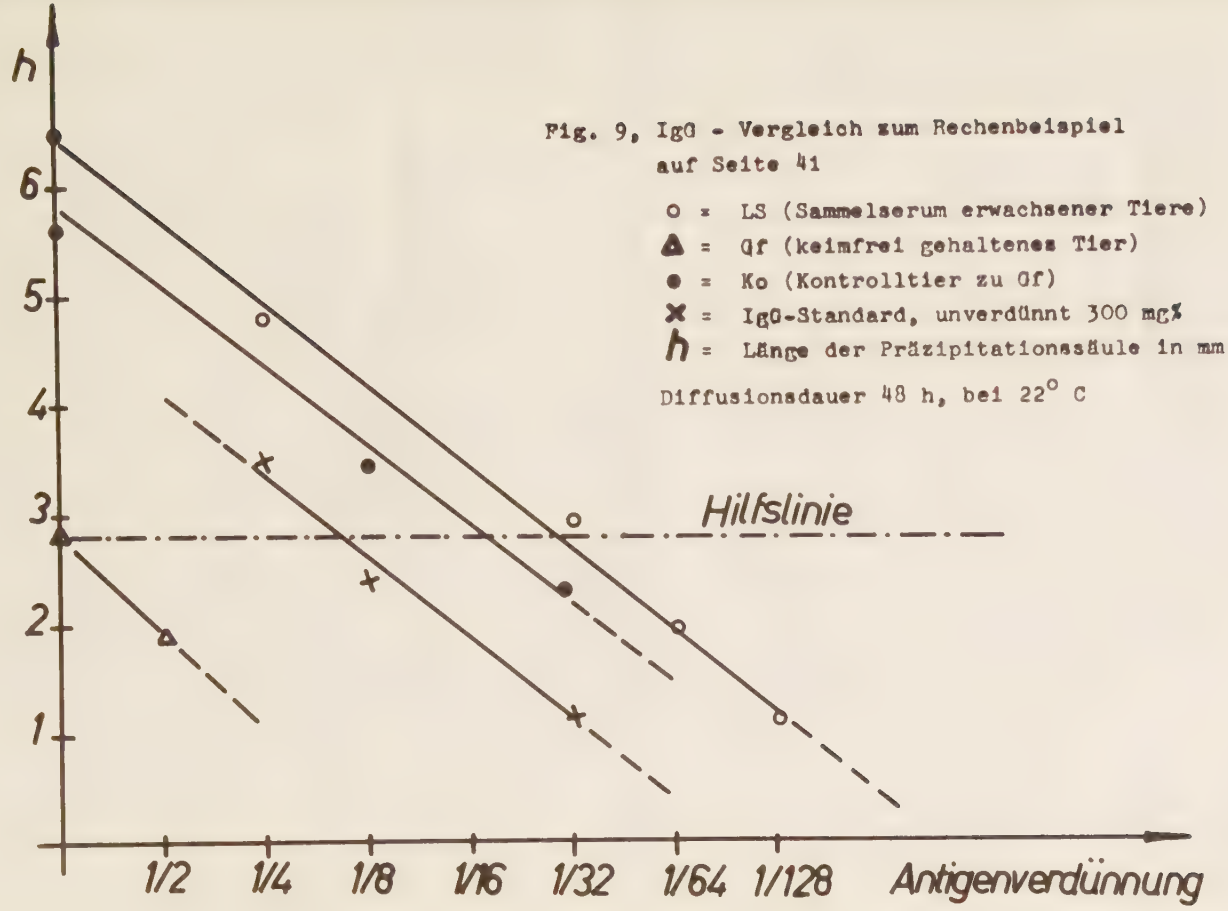


Fig. 9, IgG - Vergleich zum Rechenbeispiel
auf Seite 41

○ = LS (Sammelserum erwachsener Tiere)
▲ = Gf (keimfrei gehaltenes Tier)
● = Ko (Kontrolltier zu Gf)
✕ = IgG-Standard, unverdünnt 300 mg%
h = Länge der Präzipitationssäule in mm

Diffusionsdauer 48 h, bei 22° C

Tabelle 2

Antigen	Antigenverdünnungsstufen							
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
IgG	---	---	3,50	2,40	---	1,15	---	---
LS	6,45	---	4,80	---	---	2,95	1,95	1,10
Ko	5,60	---	---	3,45	---	2,30	---	---
Gf	2,80	1,90	---	---	---	---	---	---

Tabelle 2 : Länge der Präzipitationssäulen bei verschiedenen Antigenkonzentrationen. Werte zu Fig. 9.

IgG = Standard (unverdünnt 300 mg %)
LS = Sammelserum erwachsener Leghorntiere
Gf = keimfrei gehaltenes Tier
Ko = Kontrolltier zu Gf

3.331 Zusammenhang von Antigenkonzentration, Diffusionsdauer und Präzipitationslänge

Eine Standardserumverdünnung (1/1 bis 1/32) wird nach 24, 60, 102 Stunden und nach 9 Tagen abgelesen (siehe Fig. 10).
Die in Tabelle 3 angegebenen Werte sind Mittelwerte zweier identischer Reihen:

Tabelle 3

	Zeit in Stunden			
C_{Ag}	24	60	102	216
1/1	3,50	6,20	7,70	10,90
1/2	2,80	4,90	6,10	8,85
1/4	2,10	3,80	4,70	6,75
1/8	1,45	2,75	3,35	4,40
1/16	0,70	1,40	1,95	2,80
1/32	----	0,30	0,70	0,90

Tabelle 3 : Beziehung zwischen Länge der Präzipitationssäulen und der Diffusionsdauer

C_{Ag} = Antigenverdünnungsstufen

Tabelle 4

Berechnung der Konstanten k nach der Formel:

$$k = \frac{h}{\sqrt{t}}$$

aus den Werten von Tabelle 3:

	Zeit in Stunden				
C_{Ag}	24	60	102	216	k
1/1	0,715	0,800	0,763	0,740	0,754
1/2	0,571	0,632	0,604	0,602	0,602
1/4	0,429	0,490	0,465	0,459	0,460
1/8	0,296	0,355	0,332	0,299	0,320
1/16	0,159	0,181	0,193	0,191	0,181
1/32	-----	0,039	0,069	0,061	0,056

Tabelle 4: Abhängigkeit der Konstanten k von Zeit und Antigenkonzentration (C_{Ag})

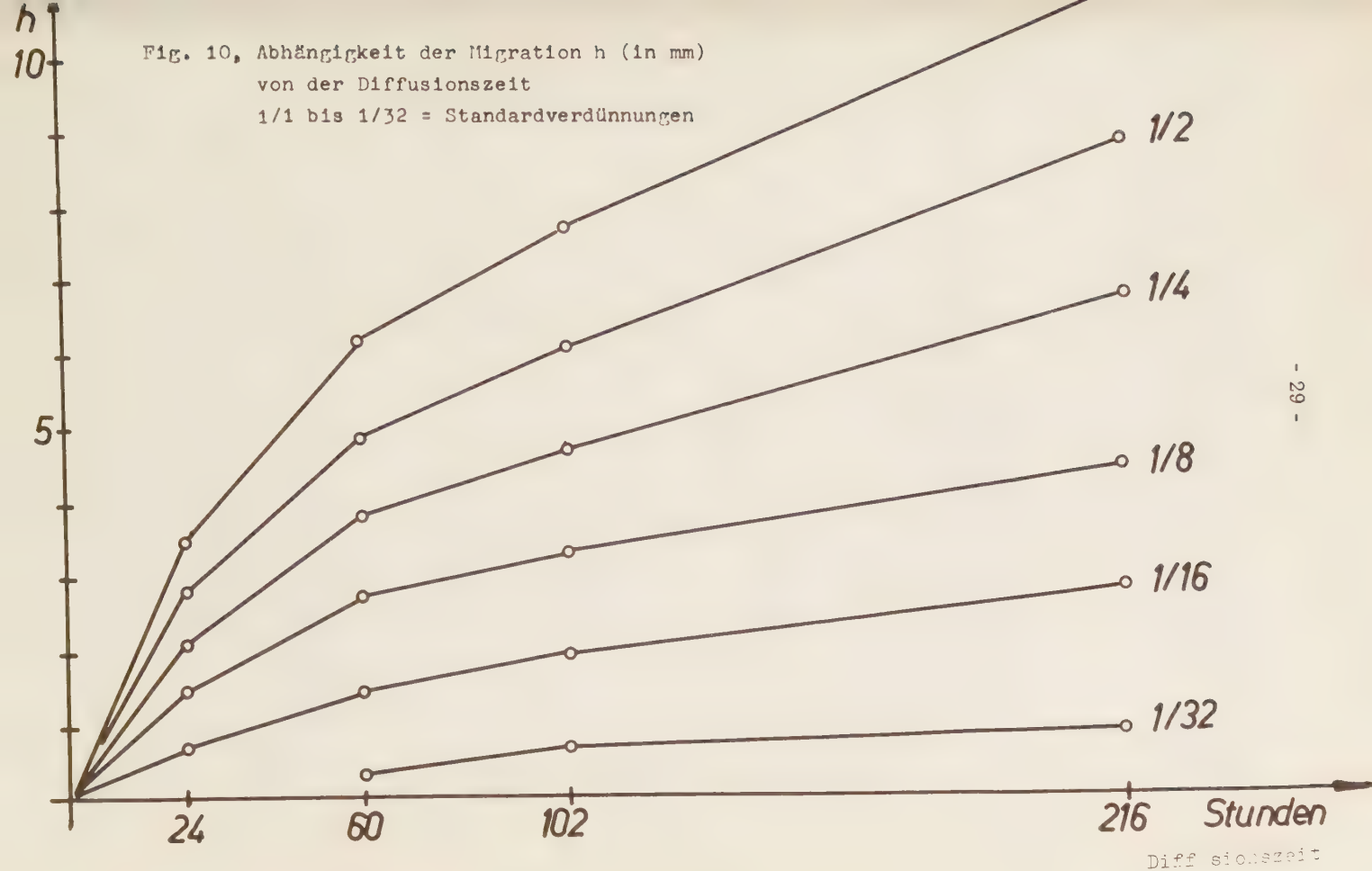


Fig. 10, Abhängigkeit der Migration h (in mm)
von der Diffusionszeit
1/1 bis 1/32 = Standardverdünnungen

Werden die Antigenkonzentrationen (C_{Ag}) und die in Tabelle 4 ermittelten Konstanten in einem halblogarithmischen System eingetragen, so ergibt sich der lineare Zusammenhang (siehe Fig. 11) :

$$\log C_{Ag} = a \frac{h}{\sqrt{t}} + b$$

3.332 Einfluß der Antiserumkonzentration

Der in 3.331 beschriebene Versuch wird mit halber Antiserumkonzentration und anderen Diffusionszeiten wiederholt :

Tabelle 5

	Zeit in Stunden		
C_{Ag}	32	50	144
1/1	4,95	6,50	10,00
1/2	4,10	5,35	8,60
1/4	3,20	4,35	6,85
1/8	2,50	3,15	5,25
1/16	1,60	2,20	3,20
1/32	----	----	2,00
1/64	----	----	0,20

Tabelle 5 : Beziehung zwischen der Länge der Präzipitationssäulen und Zeit bei halber Antiserumkonzentration wie in 3.331

C_{Ag} = Antigenverdünnungsstufen

Tabelle 6

Bestimmung der Konstanten k nach den Werten von Tabelle 5 :

	Zeit in Stunden			
C_{Ag}	32	50	144	k
1/1	0,875	0,920	0,834	0,876
1/2	0,775	0,757	0,716	0,749
1/4	0,565	0,615	0,571	0,583
1/8	0,441	0,445	0,438	0,441
1/16	0,282	0,311	0,267	0,286
1/32	-----	-----	0,167	0,167
1/64	-----	-----	0,017	0,017

Tabelle 6 : Abhängigkeit der Konstanten k von Zeit und Antigenkonzentration (C_{Ag}) bei halber Antiserumkonzentration wie in 3.331

Die in 3.332 erhaltenen Konstanten für die einzelnen Antigenverdünnungen werden ebenfalls in Fig. 11 eingetragen.
Es zeigt sich, daß die Antiserumkonzentration die Konstante b in der oben angeführten Formel beeinflußt.
Die Konstante a ist von den weiteren Versuchsbedingungen, die den Diffusionskoeffizienten beeinflussen, also der Temperatur und der Viskositätskonstanten des verwendeten Antiserum-Agar-Gemisches abhängig.

3.333 Titerabfall des Antiserums bei höheren Temperaturen

Die verhältnismäßig hohe Temperatur von + 55° C des Antiserums bei der Mischung mit Agar von + 60° C führt zu Bedenken über einen möglicherweise auftretenden, nicht konstant reproduzierbaren Titerabfall des Antiserums an spezifischen Antikörpern. Versuche werden angestellt, bei denen Antiserum bei Temperaturen von + 45, + 50, + 55, + 60, + 65, + 70 und + 75° C mit um jeweils + 5° C höher temperiertem Agar vermischt wird.

Die Ergebnisse zeigen, daß bis + 55° C nur ein geringfügiger Titerabfall eintritt, der sich bis + 65° C verstärkt. Ab + 70° C kann keine Präzipitation mehr nachgewiesen werden, das Antiserum ist also bei dieser Temperatur vollständig irreversibel inaktiviert.
Die höchstmögliche Temperatur von + 55° C wird gewählt, um eine gute, homogene Durchmischung des Antiserums mit dem Agar zu erreichen.

Auf eine detailliertere Auswertung und statistische Analyse der Oudin-Methode wird verzichtet, da sich die im Folgenden ausführliche beschriebenen einfache, radiale Immundiffusion nach Mancini als wesentlich einfacher und zur quantitativen Bestimmung großer Serummengen als geeigneter erweist.

3.4 Einfache, radiale Immundiffusion nach Mancini

3.41 Material

(1) Geschliffene Objektträger von LKB
(2) Objektträgerrahmen und Stanze mit 10-Loch-Muster (siehe Fig. 11 a) von LKB
(3) Phosphatgepufferte Agarose wie in 3.21 beschrieben, nur 3 %ig. Als Puffer wird auch der Diäthylbarituratsäure-Acetat-Puffer p_H 8, 2 nach nach Michaelis verwendet.

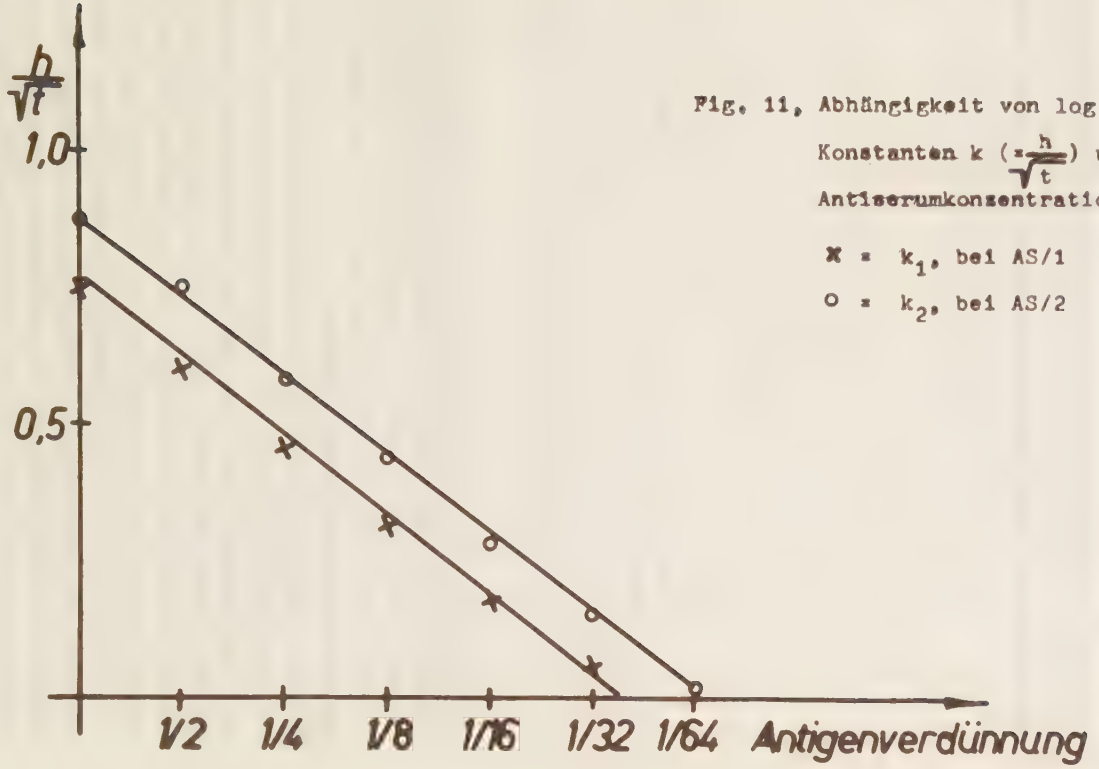


Fig. 11, Abhängigkeit von log C_{Ag} zur Konstanten k ($=\frac{h}{\sqrt{t}}$) und der Antiserumkonzentration

× = k_1, bei AS/1

○ = k_2, bei AS/2

3.42 Versuchsdurchführung

Die Diffusionsrahmen zur einfachen, radialen Immundiffusion werden im Prinzip wie in 3.21 beschrieben hergestellt, mit dem Unterschied, daß anstatt des reinen Diffusionsagars ein Antiserum-Agargemisch aufgetragen wird. Von diesem wie in 3.31 zubereiteten Gemisch aus 3 % Agar und der halben gewünschten Antiserumverdünnung werden pro Rahmenhälfte 12,5 ml aufgetragen, was einer Schichtdicke von ca. 1,8 mm entspricht. Gestanzt wird mit einem 10-Loch-Muster (siehe Fig 11 a Die ausgestanzten Gelzylinder werden wie in 3.22 entfernt.

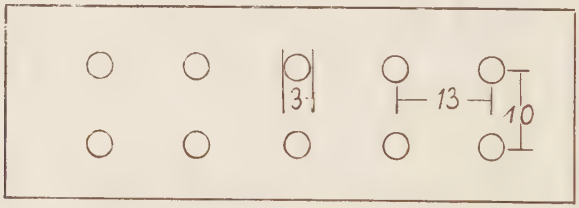


Fig. 11 a Abmessungen der LKB-Stanze mit 10-Loch-Muster, Maßstab 1 : 1

Die 60 Antigenlöcher eines Rahmens werden mit den gewünschten Antigen- bzw. Standardverdünnungen beschickt. Das Einpipettieren erfolgt mit einer fein ausgezogenen Pipette. Die Antigenlöcher werden stets randvoll pipettiert; zur besseren Kontrolle läßt sich dies vorteilhaft unter sehr schräg einfallendem Licht einer normalen Schreibtischlampe durchführen.
Von den 60 Antigenlöchern eines Rahmens werden mindestens 18 mit Standardverdünnungen gefüllt. Für jedes zu untersuchende Serum kommen je 2 x 3 verschiedene Verdünnungsstufen auf einen Rahmen, also insgesamt 7 verschiedene Seren. Die fertig pipettierten Rahmen werden in streng horizontaler Lage in eine feuchte Kammer gebracht und verbleiben dort bis zum Ende der Diffusion (siehe 3.431). Darauf wird das nicht präzipitierte Eiweiß zwei bis drei Tage unter öfterem Wechsel mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Einige Stunden Einlegen in aqua dest. und anschließendes Trocknen der Agarschicht unter anfangs gut angefeuchtetem Filterpapier folgen. Die getrockneten Objektträger werden aus dem Rahmen genommen, vorsichtig unter einem warmen Wasserstrahl von etwa anhaf-

tenden Filterpapierresten gereinigt und mit Amidoschwarz (1 g Amidoschwarz, 4,1 g Na-Acetat und 30 ml Essigsäure/Liter) angefärbt. Die Färbezeit beträgt je nach der Intensiät der Präzipitation 10 bis 15 Minuten. Auf gründliches Entfärben (mit 2 % Essigsäure) ist zu achten, um gute Kontraste der Präzipitationsringe gegen die Umgebung zu erhalten. Die Durchmesser der entstandenen Präzipitationsflächen werden mit einem Mikrofilmlesegerät abgelesen. Gemessen werden mit einem 30 cm Klarsichtlineal je ein Quer- und ein Längsdurchmesser. Sehr schwache Präzipitationen können vorher mit einem feinen Filzstift markiert werden. Alle Werte werden in cm des Mittelwertes der beiden Durchmesser angegeben. Bei einem Vergrößerungsmaßstab des Mikrofilmlesegerätes von 1 : 13 beträgt also ein angegebener Durchmesser von 13 cm auf dem Objektträger 10 mm.

3.43 Versuchsauswertung

Die abgelesenen Standardwerte - von allen Werten einer Verdünnungsstufe wird das arithmethische Mittel genommen - dienen zur Anfertigung einer Bezugskurve (siehe Fig. 12). In Tabelle 7 werden als Auswertungsbeispiel die IgM-Spiegel dreier Tiere berechnet. In Fig. 12 ist die zugehörige IgM-Bezugskurve aufgetragen.

Werden die Durchmesser (d) zur Anfertigung der Bezugskurve verwendet, so ergibt sich eine leicht gebogene Kurve, während das Auftragen quadrierter Durchmesser (d^2) zu einer Geraden führt.

Tabelle 7

Tier Bez.	Ag Verd.	d_1	d_2	$\left(\frac{d_1 + d_2}{2}\right)^2$	% IgM	V.-Fakt.	% IgM
A	1/1	9,5	9,9	94,0	9,8	1	9,8
	1/2	7,6	7,6	58,0	4,8	2	9,6
	1/4	6,6	6,8	45,0	3,0	4	12,0
B	1/4	12,7	---	161,0	19,0	4	76,0
	1/8	10,4	9,9	102,0	10,9	8	87,0
	1/16	8,1	8,2	66,5	6,0	16	96,0
C	1/16	8,2	7,9	65,0	5,8	16	93,5
	1/32	6,7	6,5	43,5	2,8	32	89,5
	1/64	5,9	6,0	35,5	1,7	64	109,0

Tabelle 7 : Berechnungsbeispiel. An drei Tieren wird der IgM-Spiegel berechnet.

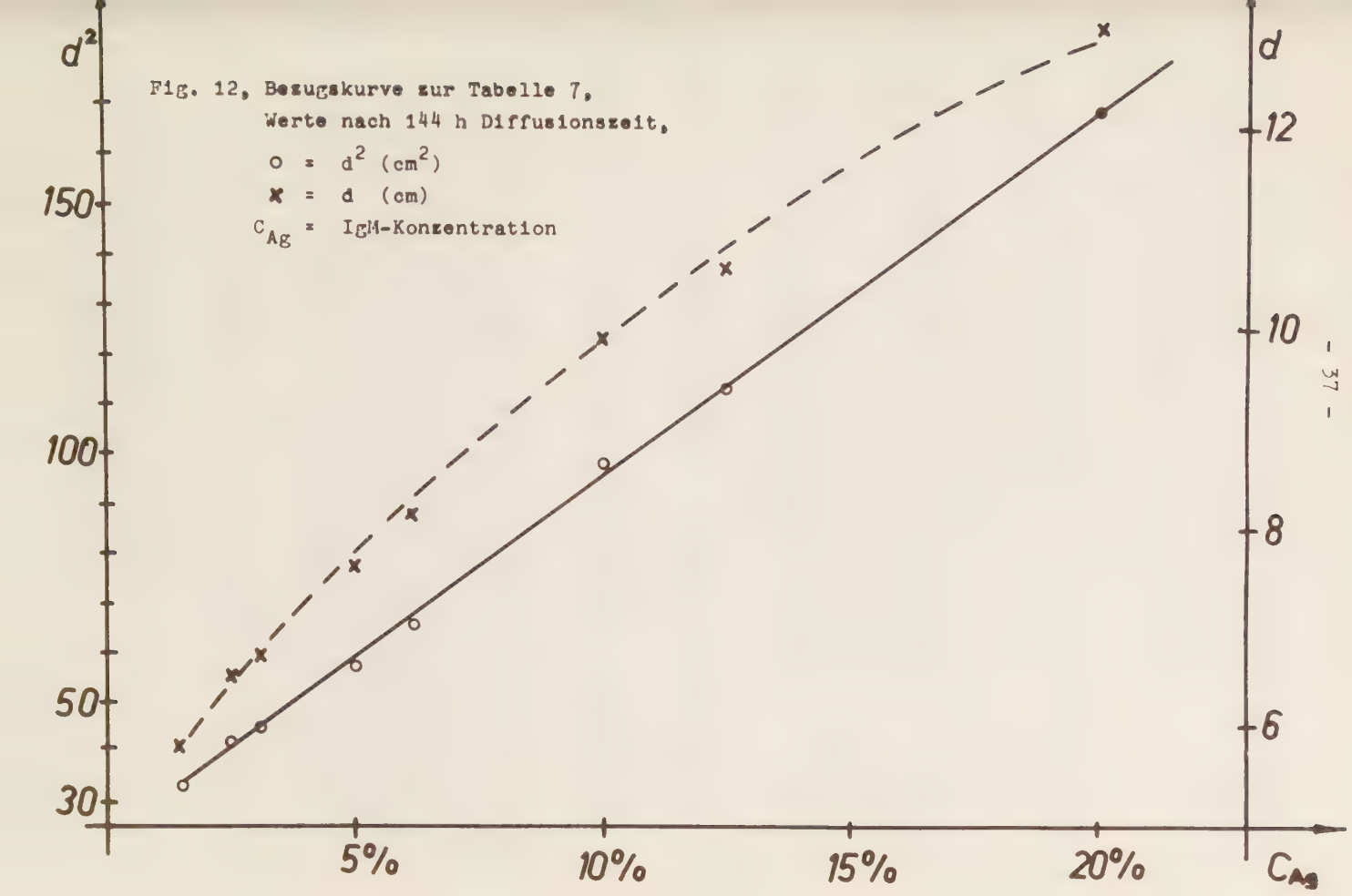


Fig. 12, Bezugskurve zur Tabelle 7,
Werte nach 144 h Diffusionszeit,
o = d^2 (cm^2)
x = d (cm)
C_{Ag} = IgM-Konzentration

Erklärungen zu Tabelle 7 :

A = keimfreies Tier, am 31. Lebenstag konventionalisiert, 3 Tage nach der Konventionalisierung

B = konventionelles Tier am 38. Lebenstag

C = keimfreies Tier, am 31. Lebenstag konventionalisiert, 20 Tage nach der Konventionalisierung

Ag Verd. = untersuchte Serumverdünnungen (Antigenverdünnung)

d_1 u. d_2 = arithmetisches Mittel von horizontalen und vertikalen Durchmessern der beiden Doppelwerte

% IgM = berechneter IgM-Spiegel der drei Tiere in Prozent des IgM-Wertes eines Serumpools erwachsener Tiere

V.-Faktor = Verdünnungsfaktor, abhängig von Ag Verd.

3.431 Beziehung zwischen Präzipitationsflächen, Zeit und Antigenkonzentration

Um die quantitative Immunglobulinbestimmung relativ schnell durchführen zu können, ist es erforderlich, den frühest möglichen Zeitpunkt zur Beendigung der Immundiffusion zu bestimmen. Identisch mit Standardverdünnungen pipettierte Rahmen werden nach verschiedenen Zeiten in das NaCl-Bad eingelegt, um die Diffusion zu beenden. Die sich ergebenden Durchmesser der Präzipitationsflächen werden nach Zeit und Antigenkonzentration in Gruppen zusammengefaßt und statistisch miteinander verglichen. Um die Mittelwerte zweier Gruppen von gleicher Antigenkonzentration, aber verschiedenen Diffusionszeiten zu vergleichen, werden die Formeln

$$t = \frac{m_A - m_B}{s} \cdot \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}}$$

$$s = \sqrt{\frac{S(x_A - m_A)^2 + S(x_B - m_B)^2}{n_A + n_B - 2}}$$

verwendet (t-Test).

Zeitversuche werden sowohl für IgG als auch für IgM angesetzt, da durch die unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten bedingt, verschiedene Ergebnisse erwartet werden müssen.

Ergebnisse :

(1) Der Zeitpunkt, an dem die Diffusion beendet ist, eine aufgestellte Bezugskurve also die Form einer Geraden annimmt, ist abhängig von der Antigenkonzentration.

(2) Die in Fig. 13 aufgetragenen Werte (IgG-Rahmen) zeigen daß bei Konzentrationen, die Durchmesser bis ca. 16 cm (= wahrer Durchmesser bis 12,3 mm) bedingen, eine Diffusionszeit von mindestens 4 Tagen eingehalten werden muß.

(3) Beim langsamer wandernden IgM (Fig. 14) muß bei Konzentrationen, die Durchmesser bis 14 cm (= wahrer Durchmesser bis 10,8 mm) bedingen, eine Diffusionszeit von mindestens 6 Tagen eingehalten werden.

3.432 Beziehung zwischen Antigenkonzentration und endgültiger Größe des Präzipitates

Nach der Auswertung von über 200 Standardkurven kann die von Mancini angeführte Formel

$$S = S_o + K \cdot Q_{Ag}$$

(s. 2.452)

bei ausreichender Diffusionszeit über den gesamten meßbaren Konzentrationsbereich bestätigt werden. Die angegebene Funktion, entspricht der Formel einer Geraden ($y = a + bx$), wobei K (bzw. b) die Steigung, S_o (bzw. a) den Abstand des Ordinatenschnittpunktes von der Abszisse angeben.

3.433 Beziehung zwischen Antiserumkonzentration und endgültiger Größe des Präzipitates

Von Mancini wird diese Korrelation ausführlich (2.453) beschrieben. Im Folgenden soll die Gültigkeit der Formel

$$K = m + n \frac{1}{C_{Ak}}$$

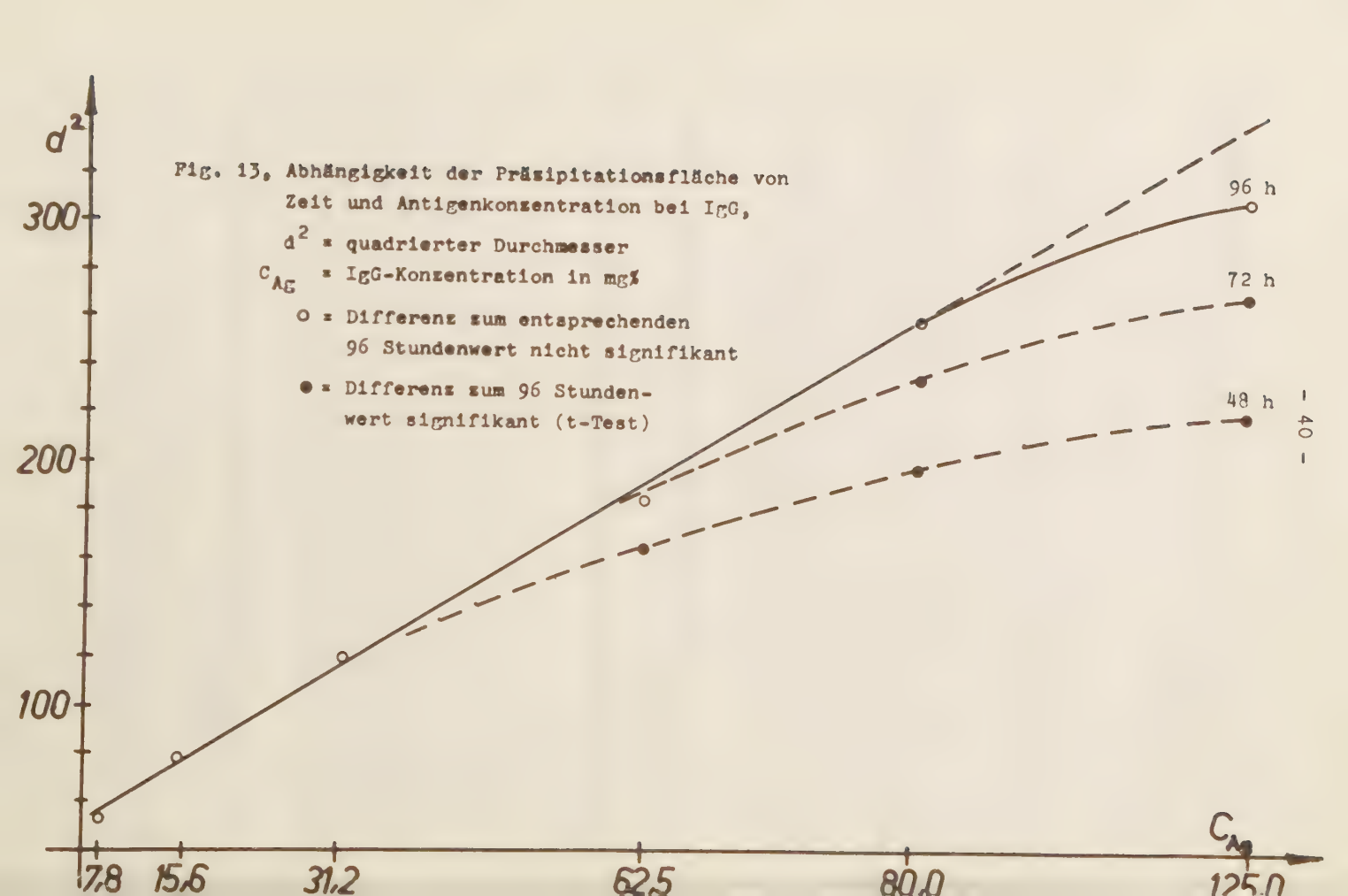


Fig. 13, Abhängigkeit der Präzipitationsfläche von Zeit und Antigenkonzentration bei IgG,

d^2 = quadrierter Durchmesser

C_{AG} = IgG-Konzentration in mg%

○ = Differenz zum entsprechenden 96 Stundenwert nicht signifikant

● = Differenz zum 96 Stundenwert signifikant (t-Test)

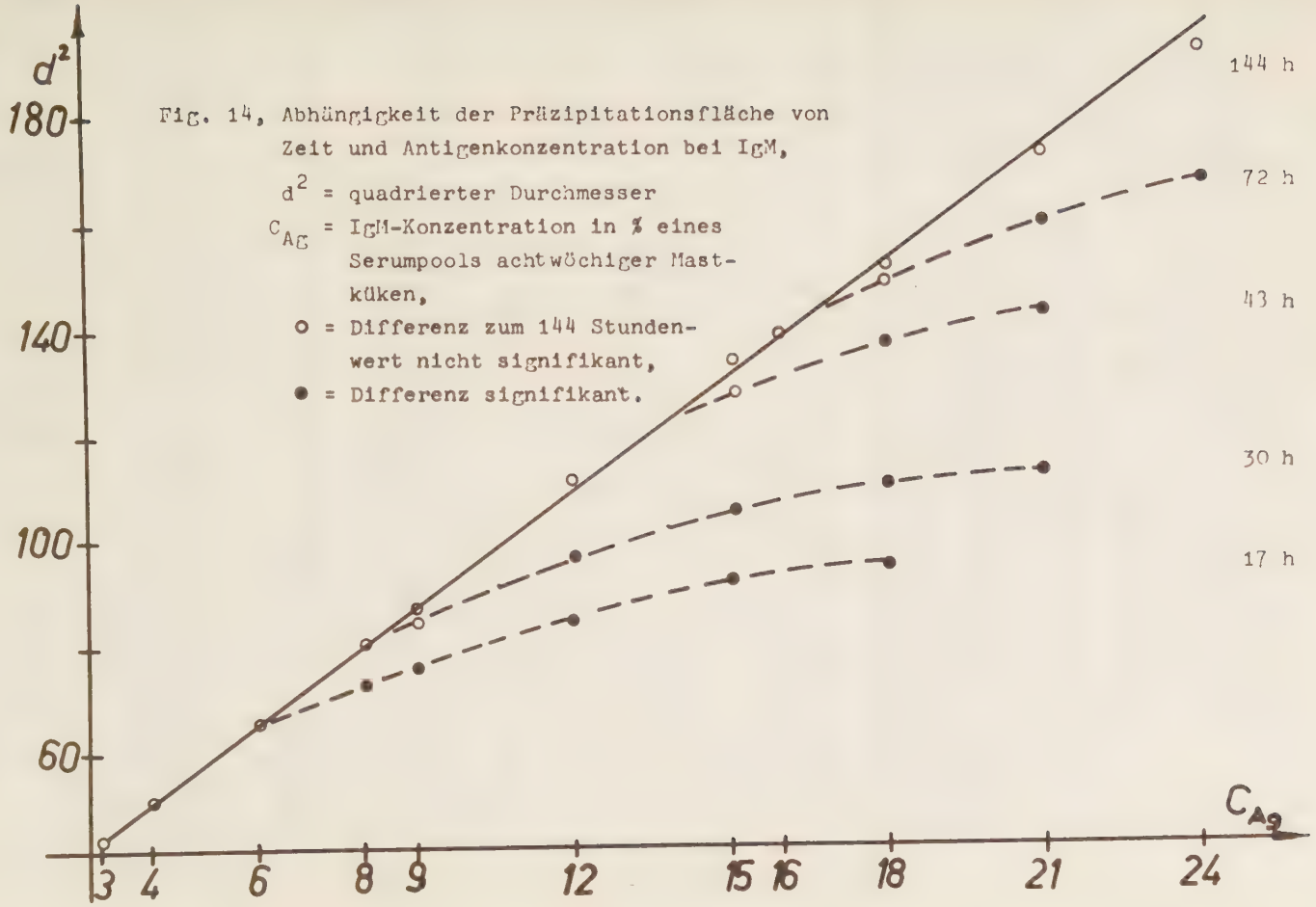


Fig. 14, Abhängigkeit der Präzipitationsfläche von Zeit und Antigenkonzentration bei IgM,

d^2 = quadrierter Durchmesser

C_{Ag} = IgM-Konzentration in % eines Serumpools achtwöchiger Mastküken,

○ = Differenz zum 144 Stundenwert nicht signifikant,

● = Differenz signifikant.

für die hier geschilderte Versuchsanstellung gezeigt werden.

K = die in der Formel $S = S_o + K \cdot Q_{Ag}$ die Steigung bestimmende Konstante

C_{Ak} = Antiserumkonzentration

m und n = von der Versuchsanordnung abhängige Konstanten

Weiterhin soll anhand eines Rechenbeispieles auf die Möglichkeit hingewiesen werden, für einen erforderlichen Meßbereich die nötige Antiserumkonzentration zu ermitteln.
In identisch mit Standardverdünnungen pipettierten Rahmen liegen, im Agargel inkorporiert, verschiedene Konzentrationen des jeweils gleichen Antiserums vor.
In Tabelle 8 und Fig. 15 sind die Ergebnisse von zwei Rahmen mit verschiedenen Anti-IgM-Konzentrationen angegeben.

Tabelle 8

Antiserumverdünnung	Antigenverdünnungsstufen						
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
1/5 (20 %)	8,0	6,7	5,9	5,4	----	----	----
1/20 (5 %)	----	12,6	9,3	7,6	6,7	5,6	5,4

Tabelle 8 : Abhängigkeit der Präzipitationsdurchmesser (in cm) von der Antiserumkonzentration (siehe Fig. 15)

In Tabelle 9 und Fig. 16 sind die Werte für das oben erwähnte Rechenbeispiel angegeben.

Voraussetzung:
Mit einem bestimmten Antiserum gegen IgG ist zur Bestimmung der IgG-Spiegel bei älteren Tieren bereits mit zwei verschiedenen Antiserumkonzentrationen gearbeitet worden (20 % und 3,3 %).

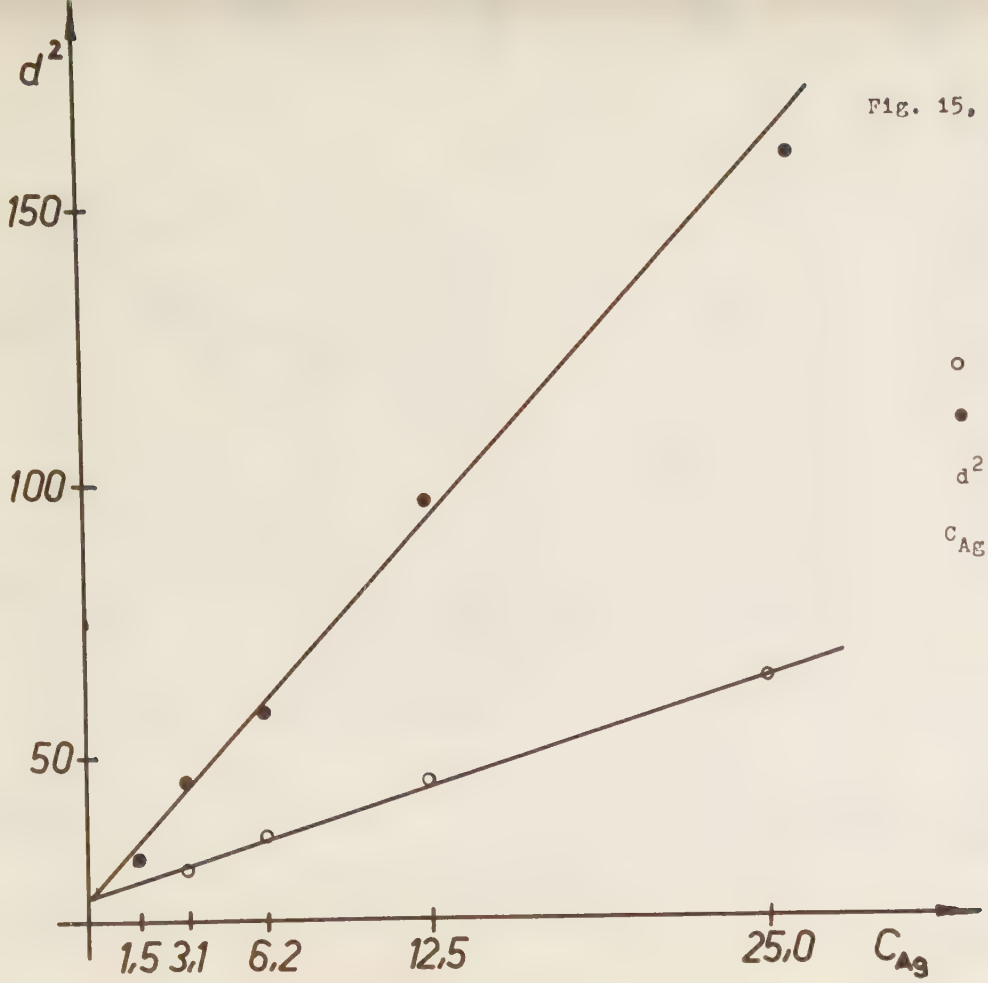


Fig. 15, Abhängigkeit der Präzipitationsdurchmesser von der Antiserumkonzentration am Beispiel zweier IgM-Versuche

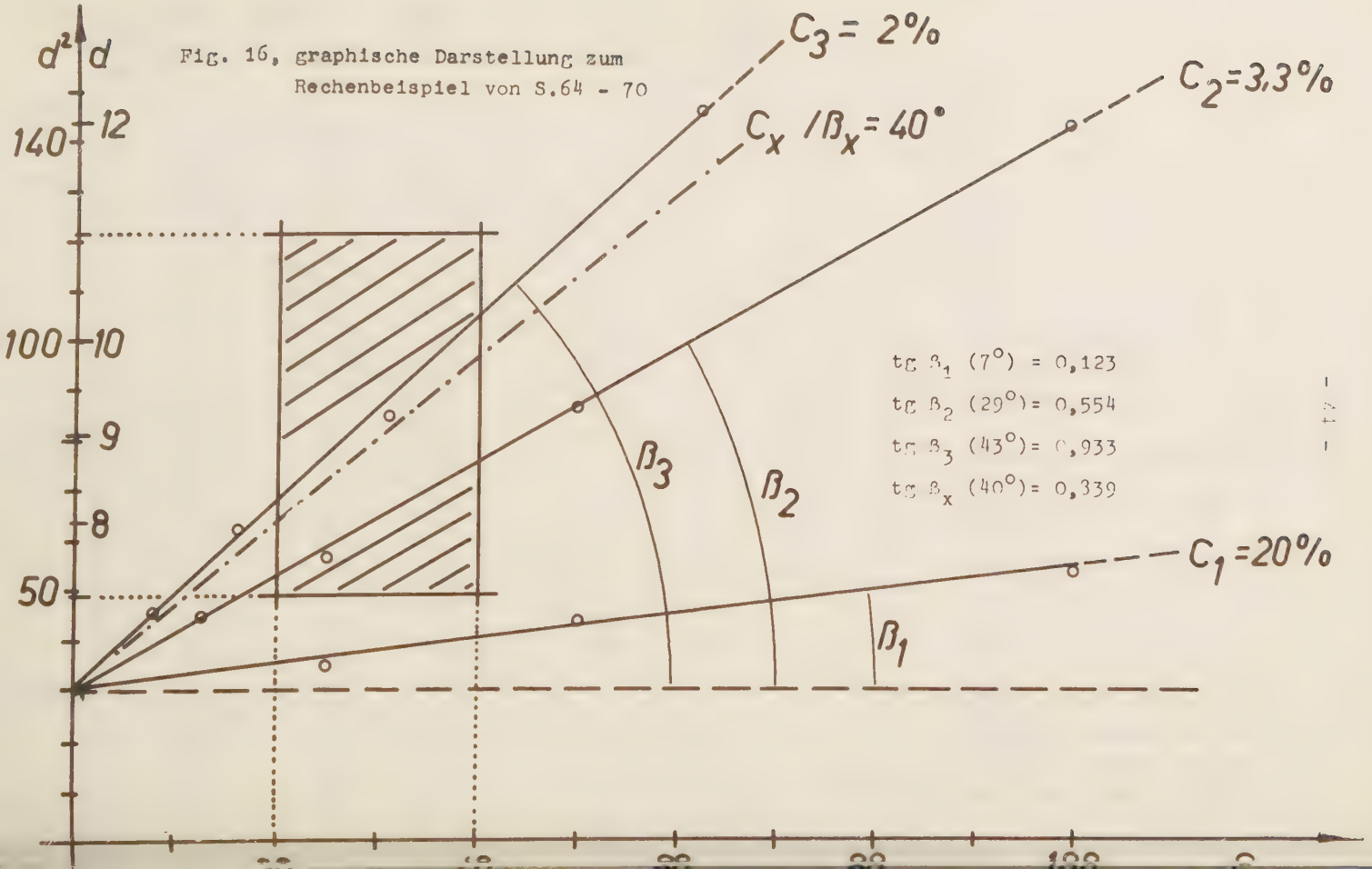
o = Werte bei AS/ 5 (20%)

● = Werte bei AS/20 (5%)

d^2 = quadrierter Durchmesser

C_{Ag} = Antigenkonzentration in % eines Serumpools achtwöchiger Mastküken

Fig. 16, graphische Darstellung zum Rechenbeispiel von S.64 - 70



Aufgabe:

Es sollen die IgG-Spiegel keimfreier Tiere bestimmt werden, die nach früheren Erfahrungen zwischen 20 und 40 mg % liegen.
Da weiterhin mittlere Präzipitationsdurchmesser von ca. 7 bis 11 cm die besten und genauesten Versuchsergebnisse gewährleisten, soll eine Antiserumkonzentration berechnet werden, bei der die zu erwartenden Werte über eine möglichst große Breite im mittleren Ablesebereich zu liegen kommen. In Fig. 16 ist der gewünschte Meßbereich graphisch durch das schraffierte Rechteck wiedergegeben.
Es wird nun willkürlich eine Bezugskurve mit einer Steigung von 40^{o} aufgestellt, die den gestellten Forderungen am besten entspricht. In der folgenden Rechnung soll ermittelt werden, welche Antiserumkonzentration für die willkürlich aufgestellte Bezugskurve benötigt wird.

Tabelle 9

Antiserum-verdünnung	Antigenverdünnungsstufen			
	1/10	1/20	1/40	1/80
1/5 (20%)	7,3	6,6	5,9	----
1/30 (3,3%)	12,0	9,3	7,5	6,7

Tabelle 9: Abhängigkeit der Präzipitationsdurchmesser (in cm) von der Antiserumkonzentration (IgG-Rahmen). Werte zum Rechenbeispiel (siehe Fig. 16)

Berechnung:

In der Gleichung

$$S = S_o + K \cdot Q_{Ag}$$

stellt K die Steigung einer aufgestellten Bezugskurve dar, ist also identisch mit dem Tangens des von der Kurve und der Abszisse eingeschlossenen Winkels (ß).
Nach Mancini - und durch die folgende Rechnung bestätigt - gilt

$$K = m + n \frac{1}{C_{Ak}}$$

also auch $$m + n \frac{1}{C_{Ak}} = tg\beta$$

Für zwei Unbekannte, m und n, können folgende Gleichungen aufgestellt werden:

(1) $$m + n \frac{1}{20} = 0,123 \ (tg\beta_1)$$

(2) $$m + n \frac{1}{3,3} = 0,554 \ (tg\beta_2)$$

---

(2) - (1) $$n \left(\frac{1}{3,3} - \frac{1}{20} \right) = 0,431$$

$$n = 1,765$$

eingesetzt in (1):

$$m + \frac{1,765}{20} = 0,123$$

$$m = 0,035$$

Für die zu ermittelnde Antiserumkonzentration (C_x) gilt

$$m + \frac{n}{C_x} = tg\beta_x \cdot C_x$$

$$C_x m + n = C_x tg\beta_x$$

$$C_x (tg\beta_x - m) = n$$

(3) $$C_x = \frac{n}{tg\beta_x - m}$$

Die gesuchte Antiserumkonzentration (Cx) soll eine Bezugskurve von 40^o Steigung ergeben, also gilt

$$tg\beta_x = tg\ 40^o = 0,839$$

eingesetzt in (3)

$$C_x = \frac{1,765}{0,839 - 0,035}$$

$$C_x = 2,2 \quad (\%)$$

Der willkürlich angenommenen Bezugskurve mit einer Steigung von 40^o entspricht also eine Antiserumkonzentration von 2,2 %.

Aus praktischen Erwägungen wird für die anstehende Bestimmung der IgG-Spiegel keimfreier Tiere eine Antiserumkonzentration von 2 % (C_3), (nicht wie errechnet 2,2 %) verwendet. Die erhaltene Bezugskurve (Tab. 10) hat eine Steigung von 43^0, liegt also im günstigsten Meßbereich.

Zur Probe in die Gleichung

$$C_3 = \frac{n}{tg\beta_3 - m}$$

eingesetzte Werte ergeben eine Konzentration von 1,97 %, die von der verwendeten Konzentration von 2 % nur unwesentlich abweicht.

Ergebnisse:

(1) Die von Mancini angegebenen Gleichungen

$$S = S_o + K \cdot Q_{Ac}$$

und

$$K = m + n \frac{1}{C_{Ak}}$$

haben für die modifizierte Versuchstechnik volle Gültigkeit.

(2) Sind von einem bestimmten Antiserum bereits zwei Konzentrationen verwendet worden, läßt sich rechnerisch für jeden gewünschten Konzentrationsbereich die bestmögliche Antiserumkonzentration ermitteln.

Tabelle 10

	Antigenverdünnungsstufen			
	1/16	1/32	1/64	1/128
Durchmesser der Präzipitate in cm	12,1	9,2	7,9	6,7

Tabelle 10: Präzipitationsdurchmesser (in cm) bei einer Antiserumkonzentration von 2 % (siehe Fig. 16)

3.434 Reproduzierbarkeit der Methode

Auf je 12 Rahmen mit Antiserum gegen IgG und IgM werden insgesamt 432 Standardwerte mit 8 bzw. 11 Verdünnungsstufen pipettiert. Die Positionen der einzelnen Konzentrationen werden versetzt angeordnet, um eventuell positionsbedingte Abweichungen erfassen zu können.
Die Rahmen werden nicht in einem Arbeitsgang hergestellt, um auch Fehler, die durch ungleichmäßiges Zubereiten der Agar-Antiserummischung entstehen können, bei der Berechnung der Standardabweichung zu berücksichtigen.
Die Standardabweichung der Werte innerhalb einzelner Verdünnungsstufen wird nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{S(x - m)^2}{n - 1}}$$

berechnet.

s wird in Prozent des arithmetischen Mittels angegeben (s %).

Tabelle 11

Antigen Standard	Anti-IgG 1 % IgG Mittelw. mg %	s %	Anti-IgM BS = 100 % Mittelw. %	s %
1/8	16,6	4,4	10,5	2 7
1/10	---	---	9,8	4,3
1/16	14,0	3,2	8,0	3,5
1/20	---	---	7,7	2,2
1/32	11,0	5,0	6,7	3,4
1/40	---	---	6,5	2,5
1/64	9,0	6,3	5,8	4,5
1/80	---	---	5,7	3,5
1/128	7,3	5,0	5,5	4,8
1/160	---	---	5,4	4,1
1/256	6,4	7,0	5,2	5,4
1/512	5,7	4,9	---	---
1/1024	5,4	6,1	---	---
Mittelwert aller s %	---	5,2	---	3,7

Zu Tabelle 11 : Bestimmung des experimentellen Fehlers (Standardabweichung) bei Anti-IgG- und Anti-IgM-Rahmen

Ergebnisse :

(1) Zwischen einzelnen Positionen und verschiedenen Rahmen können keine statistisch gesicherten Unterschiede festgestellt werden.

(2) Der mittlere Fehler (Streuung, Standardabweichung, mittlere quadratische Abweichung), ausgedrückt in Prozent des Mittelwertes der betreffenden Standardverdünnung, schwankt bei den IgG-Rahmen von 3,2 bis 7,0 % (arithmetisches Mittel ist 5,2 %), bei den IgM-Rahmen von 2,2 bis 5,4 % (arithmetisches Mittel ist 3,7 %).

3.435 Empfindlichkeit der Methode

Die letzten nachweisbaren Immunglobulinmengen hängen nach 3.433 vor allem von der Antiserumkonzentration ab.
Der Antiserumverdünnung sind wieder Grenzen gesetzt durch die geringer werdende Intensität größer werdender Präzipitationsflächen.
Bei einer Antiserumkonzentration von 1/50 (Anti-IgG) können Verdünnungen bis 1/4000 des IgG-Standards (1 %) abgelesen werden. Die untere Nachweisgrenze liegt also bei 0,25 mg % oder 0,0025 mg/ml. Bei einer Antiserumkonzentration von 1/30 (Anti-IgM) können Verdünnungen bis 1/256 des IgM-Standards (BS = 100 %) abgelesen werden. Der IgM-Spiegel erwachsener Tiere muß nach den bisherigen Untersuchungen zwischen 60 und 100 mg % angenommen werden. Dementsprechend läge die untere Nachweisgrenze für IgM bei 0,23 bzw. 0,38 mg %. Eine - allerdings mehr theoretische - Möglichkeit besteht, die untere Nachweisgrenze noch erheblich herabzusetzen.

Versuch:
Die unteren Verdünnungsstufen eines IgM-Standards (1/80, 1/128, 1/160, 1/256) werden jeweils nach dem Eindiffundieren des Antigens in das Gel ein zweites und drittes Mal einpipettiert.

Ergebnis:
Die Durchmesser der Präzipitationen erhöhen sich um ca. 20 bzw. 40 Prozent, was der tatsächlichen Verdoppelung bzw. Verdreifachung der Antigenmenge entspräche.

Auf diese Weise lassen sich also mögliche Konzentrationen bis 0,12 bzw. 0,19 mg % IgM nachweisen (siehe Fig. 17). Nachteilig wirkt sich die sehr schwache Intensität aus, die die Präzipitationsflächen bei mehrmals pipettiertem Antigen aufzeigen.

Tabelle 12

Antigenverdünnung	d_1	s %	d_2	s %	d_3	s %
1/80	5,8	3,5	6,8	2,5	7,8	2,8
1/128	5,5	4,8	6,6	5,3	7,5	1,9
1/160	5,4	4,1	6,5	3,3	7,3	5,8
1/256	5,2	5,4	6,3	5,9	7,1	5,7
1/512	--	--	5,9	2,4	6,7	5,4

Tabelle 12: Einfluß mehrmaligen Pipettierens auf die Empfindlichkeit der Methode

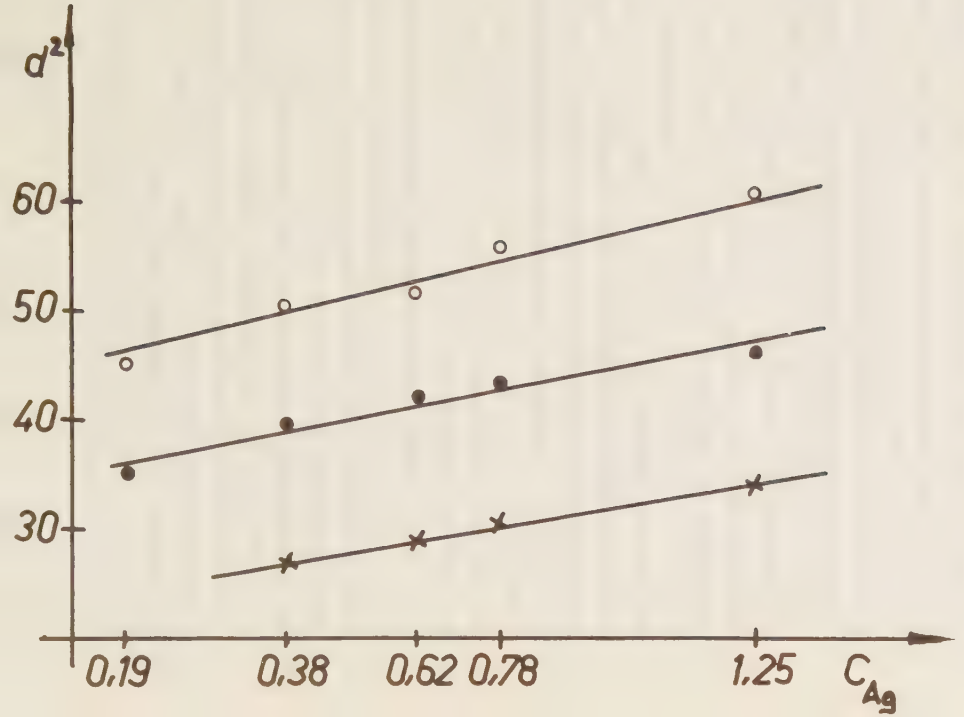
d_1 = Durchmesser bei einmal pipettiertem Antigen

d_2 = Durchmesser bei zweimal pipettiertem Antigen

d_3 = Durchmesser bei dreimal pipettiertem Antigen

s % = Standardabweichung s in Prozent des Mittelwertes

Fig. 17, Einfluß mehrmaligen Pipettierens auf die Präzipitationsfläche



d^2 = quadrierter Durchmesser

× = 1 x pipettiert

● = 2 x pipettiert

○ = 3 x pipettiert

C_{Ag} = Antigenkonzentration in % eines Serumpools achtwöchiger Mastküken

3,5 Diskussion der Methoden

Die angegebene doppelte, zweidimensionale Diffusion soll lediglich als grobes Schätzverfahren betrachtet werden. Sehr viel genauere Bestimmungen werden von mehreren Autoren (z.B. Gell (47)) beschrieben. Nützlich erweist sich dieses Schätzverfahren jedoch wegen der Schnelligkeit, mit der sie durchführbar ist, um die geeigneten Antigenverdünnungsstufen auszuwählen, die dann in der einfachen, radialen Diffusion quantitativ untersucht werden. Mit der beschriebenen eindimensionalen, einfachen Diffusion (Oudin) lassen sich sehr genaue quantitative Untersuchungen durchführen. Wegen des ziemlich zeitraubenden und umständlichen Versuchsablaufes wird jedoch der einfachen, radialen Immundiffusion der Vorzug gegeben. Während bei der eindimensionalen Diffusion für die Länge der Präzipitation nur die Antigenkonzentration, nicht aber die absolute Antigenmenge eine Rolle spielt, liegen bei der radialen Diffusion die Verhältnisse gerade umgekehrt. Gleiche, kristallisierte Antigenmengen im Antigenloch in 2, 4, 8 und 16 µl Puffer aufgelöst ergeben bei Mancini identische, nur geringfügig parallel verschobene Kurven.

Werden, wie bei Mancini, die Antigenlösungen mit Hilfe von Mikrolitерspritzen einpipettiert, um konstante Antigenmengen zu erhalten, muß selbstverständlich die Dicke der Gelschicht des Antigen-Antiserumgemisches absolut konstant gehalten werden.

Bei der hier beschriebenen Methode ist diese absolute Konstanz nicht erreichbar. Um also ein konstantes Verhältnis von Antigenmenge zur Dicke des Agars zu erreichen, müssen die Antigenlöcher stets genau voll pipettiert werden, eine Methode wie sie auch Fahey (66) beschreibt. Abweichungen ergeben sich in der Dauer der Diffusionszeit zwischen den eigenen Versuchen und denen von Fahey und Mancini. Während Mancini Mindestzeiten für IgG und IgM von 7 bzw. 10 Tagen angibt, läßt Fahey die Diffusion "über Nacht" ablaufen (überdies bei einer Temperatur von + 4 bis + 10° C, bei der Mancini Diffusionszeiten bis zu 14 Tagen angibt).

Die in 3.431 geschilderten, statistisch ausgewerteten Versuche zeigen, daß eine Nacht keineswegs genügt, um die Präzipitation vollständig ablaufen zu lassen. Fahey erhält auch bei gleicher Konzentration für das langsamer wandernde IgM wesentlich kleinere Präzipitationsflächen als bei IgG, ein Zeichen, daß die Diffusion noch nicht beendet war. Der Unterschied in der Diffusionszeit zu Mancini erklärt sich mit den wesentlich höheren Antigenkonzentrationen, die in seinen Versuchen verwendet werden, die also auch wesentlich größere Durchmesser seiner Präzipitationsflächen bedingen. Der Versuch 3.431 zeigt, daß eine Diffusionszeit von 4 Tagen bei Durchmessern bis 16 cm (also 12,3 mm wahrer Durchmesser) für IgG und von 6 Tagen bei Durchmessern bis 14 cm für IgM

durchaus genügend ist. Die von Becker u.a. (67) für eine Modifikation der einfachen, radialen Immundiffusion angegebene Diffusionszeit von 2 Tagen läßt sich mit den noch geringeren Präzipitationsdurchmessern bei der von diesen Autoren angegebenen Versuchsanordnung erklären.
Der Vorteil dieser relativ kurzen Diffusionszeit von 2 Tagen macht die erwähnte Modifikation für klinische Laboruntersuchungen brauchbar, während bei den eigenen Bestimmungen der Nachteil der längeren Diffusionszeit zugunsten genauerer Meßergebnisse in Kauf genommen wird. Die Standardabweichung (mittlerer Fehler) der eigenen Versuche liegt zwischen denjenigen von Mancini und Fahey. Während Mancini 2 % und Fahey - getrennt nach IgG und anderen Immunglobulinen - 7,5 bzw. 10 % angibt, werden in eigenen Versuchen die Standardabweichungen mit 5,2 % (bei IgG) und 3,7 % (bei IgM) ermittelt.

Die höhere Standardabweichung bei Fahey erklärt sich aus der Kürze seiner Diffusionszeit:
Werden die Durchmesser abgelesen, bevor alles Antigen an Antikörper gebunden ist, spielt selbstverständlich das Molekulargewicht des Antigens eine mitbestimmende Rolle, da es den Diffusionskoeffizienten beeinflußt. IgA aber, zum Beispiel, hat sich als Gemisch verschieden schwerer Moleküle mit Sedimentationskonstanten von 6 S bis 13 S erwiesen, eine Tatsache, die sich auf die Standardabweichung auswirken muß, wenn während der Diffusionszeit abgelesen wird.
Zur Empfindlichkeit der Methode gibt Mancini 0,125 mg % an (0,0025 mcg in 2 µl), Fahey stellt bei 0,3 mg % die untere Nachweisgrenze fest. In eigenen Versuchen wird - ohne mehrmaliges Pipettieren - eine untere Nachweisgrenze von 0,23 mg % gefunden. Mit Hilfe mehrmaligen Pipettierens kann die untere Nachweisgrenze auf 0,12 mg % gesenkt werden.

Zusammenfassend werden die wichtigsten Daten der Methoden von Mancini, Fahey und eigenen Versuchen in einer Tabelle verglichen.

Tabelle 13

	Mancini (61)	Fahey (66)	eigene Versuche
Diffusionszeit	7 - 10 Tage	über Nacht	4 - 6 Tage
Standard-abweichung	1,7 - 2 %	7,5 - 10 %	3,7 - 5,2 %
Untere Nachweisgrenze	0,125 mg %	0,3 mg %	0,23 mg % (0,12 mg %)

4. Quantitative Untersuchungen der Immunglobulinspiegel bei konventionellen, keimfreien und konventionalisierten Küken.

4.1 Untersuchungen an konventionellen Tieren

4.11 Material und Methoden

50 Eintagsküken der HNL- (Heissdorf-Nelson-Lohmann) Rasse werden aus der Brüterei Heinrichsruh bezogen. Als Eintagsküken gelten selektierte, männliche Tiere im Alter von 20 bis 36 Stunden.
Vom ersten bis zum 76. Lebenstag werden von jeweils 3 bis 6 Tieren Blutproben entnommen. Die Blutentnahme geschieht bis zum 31. Lebenstag durch Herzpunktion, ab diesem Zeitpunkt aus der Flügelvene. Entnommen werden jeweils 0,5 - 1 ml Blut.
Die IgG- und IgM-Spiegel in den Seren der Einzeltiere werden mit der oben beschriebenen einfachen, radialen Immundiffusion quantitativ bestimmt.

4.12 Ergebnisse

Die arithmetischen Mittel der IgG- und IgM-Spiegel aller Tiere pro Untersuchungstag werden in Tabelle 14 angeführt und in Fig. 18 und Fig. 19 graphisch dargestellt.

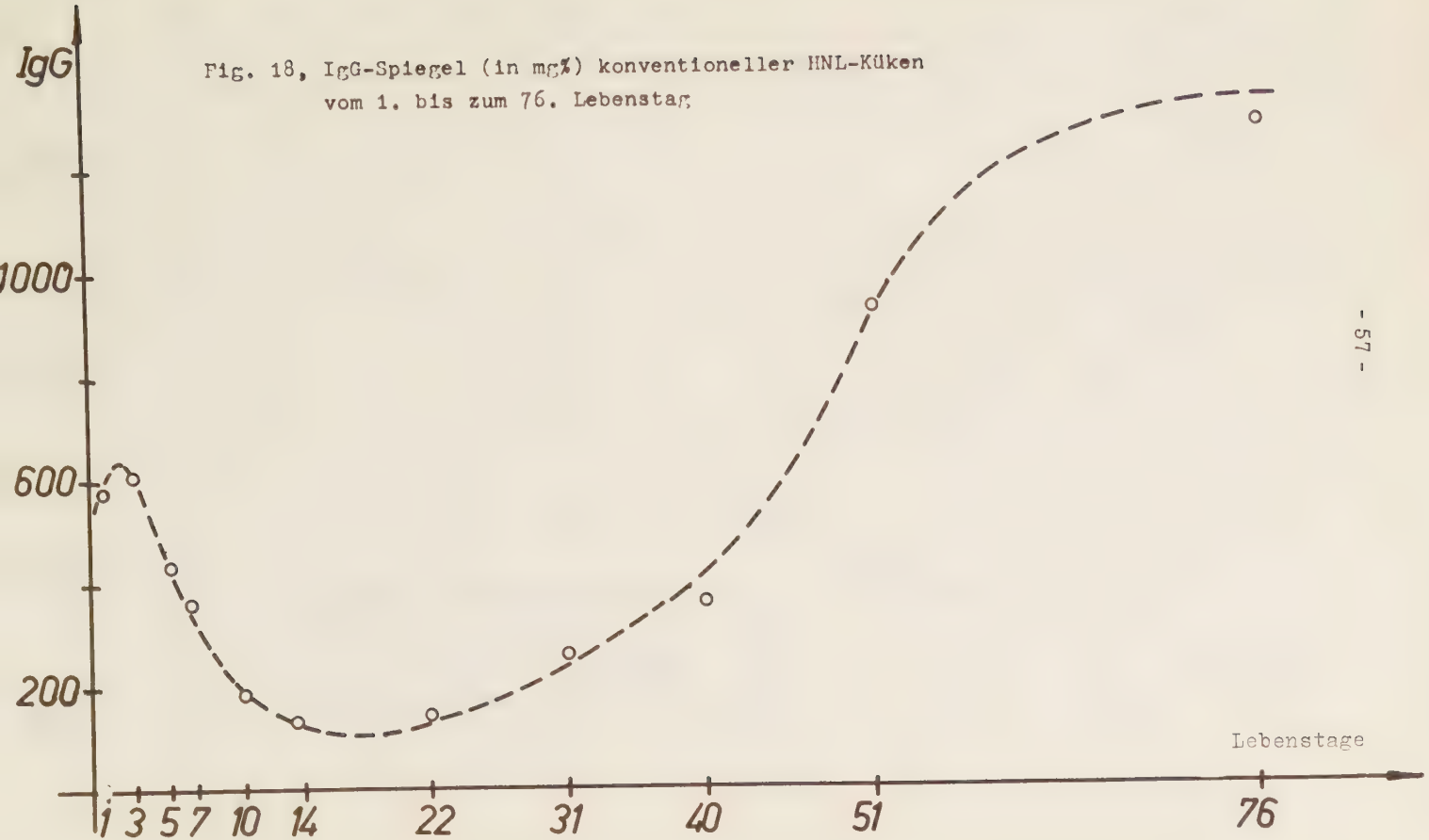


Fig. 18, IgG-Spiegel (in mg%) konventioneller HNL-Küken vom 1. bis zum 76. Lebenstag

Fig. 19, IgM-Spiegel konventioneller HNL-Küken vom 1. bis zum 76. Lebenstag.

IgM wird in % eines Serumpools acht-wöchiger Mastküken ausgedrückt.

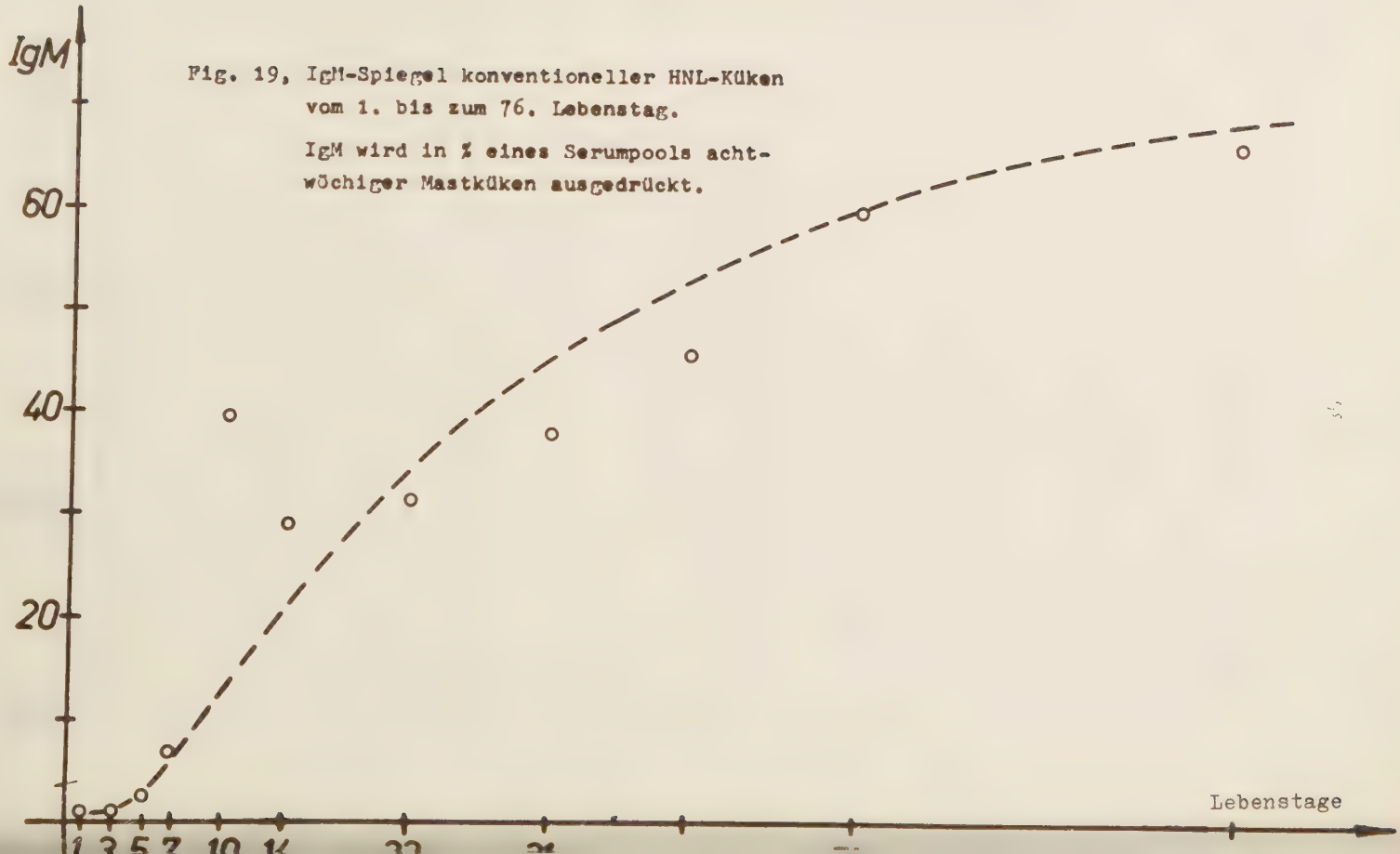


Tabelle 14

Alter in Tagen	Tierzahl	IgG in mg %	s %	Tierzahl	IgM in %	s %
1	5	590	± 29	5	1,04	± 33
3	5	610	± 52	4	1,17	± 18
5	5	435	± 52	4	2,52	± 48
7	5	364	± 32	4	7,20	± 74
10	5	187	± 57	5	39,60	± 28
14	4	135	± 17	6	28,00	± 27
22	3	124	± 19	4	31,40	± 11
31	5	260	± 92	6	38,10	± 26
40	5	360	± 41	3	46,00	± 18
51	5	930	± 58	51	60,00	± 19
76	4	1280	± 28	6	67,00	± 30

Zu Tabelle 14 : IgG- und IgM-Spiegel konventioneller Tiere

IgG : Immunglobulin-G-Gehalt in mg %

IgM : Immunglobulin-M-Gehalt in Prozent eines Serumpools acht Wochen alter Mastküken (BS = 100 %)

s % : Individuelle Schwankung, berechnet über die Streuung s.

Die individuellen Schwankungen werden nach der Formel zur Berechnung der Streuung

$$s = \sqrt{\frac{S(x - m)^2}{n - 1}}$$

bestimmt und in Prozent der Mittelwerte ausgedrückt (s %).

4.13 Diskussion

Der Immunglobulin-G-Spiegel des Huhnes verhält sich im Grunde genommen wie der des Säugers. Der Säuger wird- abgesehen von der embryonalen Zufuhr von Immunglobulinen der Mutter über die Plazenta (z.B. bei Primaten und Nagern) - ohne Immunglobuline geboren. Innerhalb der Säuger entspricht die Maus am ehesten den Verhältnissen des Huhnes (Fahey (68)).
Von der Geburt bis zu einer tierartlich verschiedenen Zeit (z.B. 36 Std. bei Pferd und Hund, 16 Tage bei der Maus; Brambell R. (69)) vollzieht sich im Säuger ein rascher Anstieg der Immunglobulinspiegel durch das Kolostrum. Beim Huhn tritt dieser Anstieg durch die Resorption von IgG aus dem Dottersack etwas früher ein (bereits vor dem Schlupf), hält innerhalb der ersten beiden Lebenstage an, um dann gemäß der Halbwertszeit von Immunglobulinen im Körper (von Patterson u.a. (70) werden 72 Stunden für Serumgammaglobulin angegeben) rasch abzufallen. Dieser Abfall entspricht genau dem des Säugers, der ab den oben genannten Zeitpunkten nicht mehr in der Lage ist, durch das Kolostrum aufgenommene Immunglobuline zu verwerten.
Dieser steile Abfall des IgG-Spiegels beim Huhn wird - vergleichbar zu dem der Maus - nach etwa drei Wochen von der Eigenproduktion abgefangen.

Ab diesem Zeitpunkt tritt eine stetige Vermehrung des IgG-Spiegels ein. Etwa bei einem Lebensalter von 70 Tagen wird der IgG-Spiegel erwachsener Tiere erreicht.
Anders gelegen sind die Verhältnisse beim IgM-Spiegel des Huhnes. Das frischgeschlüpfte Tier erhält über den Dottersack keine meßbaren Mengen an IgM - wohl aus Gründen der hochmolekularen Struktur dieses Immunglobulins (siehe auch Asofsky u.a. (71)). Dies führt dazu, daß der IgM-Spiegel vom ersten Tag an ausschließlich von der eigenen Produktion des Tieres abhängt. Der vergleichbar wesentlich steilere Anstieg des IgM zum IgG stimmt aber mit der allgemeinen Beobachtung überein, daß das IgM vor allem für die erste immunologische Antwort eines Tieres auf antigene Reize verantwortlich ist.
Der anfangs sehr steile Anstieg verflacht allmählich, die Tiere haben am 76. Lebenstag noch nicht die Spiegel Erwachsener (100 %) erreicht.

4.2. Untersuchungen an keimfreien Tieren

4.21 Material und Methoden

Schlupf, Haltung und Fütterung von keimfreien Tieren der Nichols-Lohmann-Mastrasse finden nach den von Merkenschlager und Mitarbeitern beschriebenen Verfahren statt (72).
An den in Tabelle 15 bezeichneten Tagen werden jeweils 4 bis 18 Tiere den Keimfrei-Einheiten entnommen, entblutet und in den gewonnenen Seren mit der einfachen, radialen Immundiffusion die IgG- und IgM-Spiegel bestimmt. Parallel dazu werden gleiche Zahlen der zugehörigen Kontrolltiere untersucht.

Tabelle 15

Keimfreie Tiere	Alter in Tagen	Tier-zahl	IgG in mg %	s %	IgM in %	s %
	5	12	320	± 34,3	2	± 43,1
	15	10	44	± 29,2	5	± 28,2
	20	40	42	± 33,0	7	± 31,7
	35	4	32	± 52,2	11	± 48,2
	40	4	20	± 58,2	9	± 48,8
	50	4	25	± 26,8	9	± 23,9
	60	4	31	± 29,4	9	± 15,0
	70	4	28	± 43,3	13	± 18,7
	80	4	32	± 37,8	15	± 25,7
	90	4	28	± 49,1	12	± 17,6

IgG : Immunglobulin-G-Gehalt in mg %

IgM : Immunglobulin-M-Gehalt in Prozent eines Serumpools acht Wochen alter Tiere

s % : Individuelle Schwankung, berechnet über die Streuung s

Fortsetzung Tabelle 15

Konventionelle Kontrollen	Alter in Tagen	Tier-zahl	IgG in mg %	s %	IgM in %	s %
	5	22	480	± 32,8	10	± 57,3
	15	19	275	± 30,2	27	± 20,3
	20	62	304	± 30,3	41	± 19,1
	35	8	852	± 26,0	83	± 33,7
	40	37	867	± 42,7	112	± 45,2
	50	26	1050	± 35,1	101	± 56,4
	60	19	1200	± 25,8	103	± 58,2
	70	19	1200	± 24,1	81	± 43,3
	80	19	1400	± 33,7	144	± 47,9
	90	19	1400	± 36,3	154	± 61,0

Tabelle 15 : IgG- und IgM-Spiegel im Serum keimfreier Küken und konventioneller Kontrolltiere

4.22 Ergebnisse

In Fig. 20 und 21 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die individuellen Schwankungen (s %) werden wie in 4.12 berechnet.

4.23 Diskussion

Für die IgG-Spiegel keimfreier Küken, die ohne bemerkenswerten antigenen Reiz aufgezogen werden, gilt für die ersten 14 Lebenstage grundsätzlich das in 4.13 Gesagte. Der wesentliche Unterschied besteht in der äußerst schwachen eigenen IgG-Produktion, die nicht in der Lage ist, den Abfall des Serumspiegels an mütterlichem IgG abzufangen. Die Tiere bleiben also auf einem sehr tiefen IgG-Spiegel während der ganzen keimfreien Haltung stehen, dessen Höhe von dem noch vorhandenen geringgradigen antigenen Reiz abhängig ist. Der IgM-Spiegel beginnt wie beim konventionellen Tier mit nicht meßbar niedrigen Werten, zeigt dann einen nur sehr zögernden Anstieg, der - wiederum von Spuren des verbliebenen antigenen Stimulus abhängig - auf sehr niederen Werten stehen bleibt. In der Relation zu den IgG-Werten, zeigen die IgM-Spiegel allerdings keine so hochgradige Depression.

4.3 Untersuchungen an konventionalisierten Küken

4.31 Material und Methoden

Bereits in einem anderen Zusammenhang von Merkenschlager und Mitarbeitern (72) beschriebene Nichols-Lohmann-Mastküken werden am 31. Lebenstag den Keimfrei-Einheiten entnommen und weitere 27 Tage auf ihren IgG- und IgM-Spiegel - wieder mit einfacher, radialer Immundiffusion - untersucht. Parallel dazu werden die Immunglobulinspiegel der zugehörigen Kontrolltiere bestimmt. Bedingt durch das relativ hohe Alter der Tiere können durchlaufende Untersuchungen an Einzeltieren vorgenommen werden, was bei den jüngeren Tieren der Versuche 4.1 und 4.2 wegen der relativ hohen Sterblichkeitsziffer bei der Herzpunktion nicht möglich ist.

4.32 Ergebnisse

In Tabelle 16 und den Figuren 22 und 23 werden die ermittelten Immunglobulinspiegel angeführt. Alle IgG- und IgM-Werte werden mit den Formeln zum Vergleich zweier Mittelwerte

$$t = \frac{m_A - m_B}{s} \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}}$$

$$s = \sqrt{\frac{S\,(x_A - m_A)^2 + S\,(x_B - m_B)^2}{n_A + n_B - 2}}$$

überprüft (t-Test).

Am 11. Tag nach der Konventionalisierung bei IgG und am 7. Tag bei IgM bestehen statistisch nur noch zu 95 % gesicherte Differenzen zwischen konventionalisierten Küken und Kontrolltieren, ab dem 15. bzw. 11. Tag können keine statistisch gesicherten Differenzen mehr festgestellt werden.

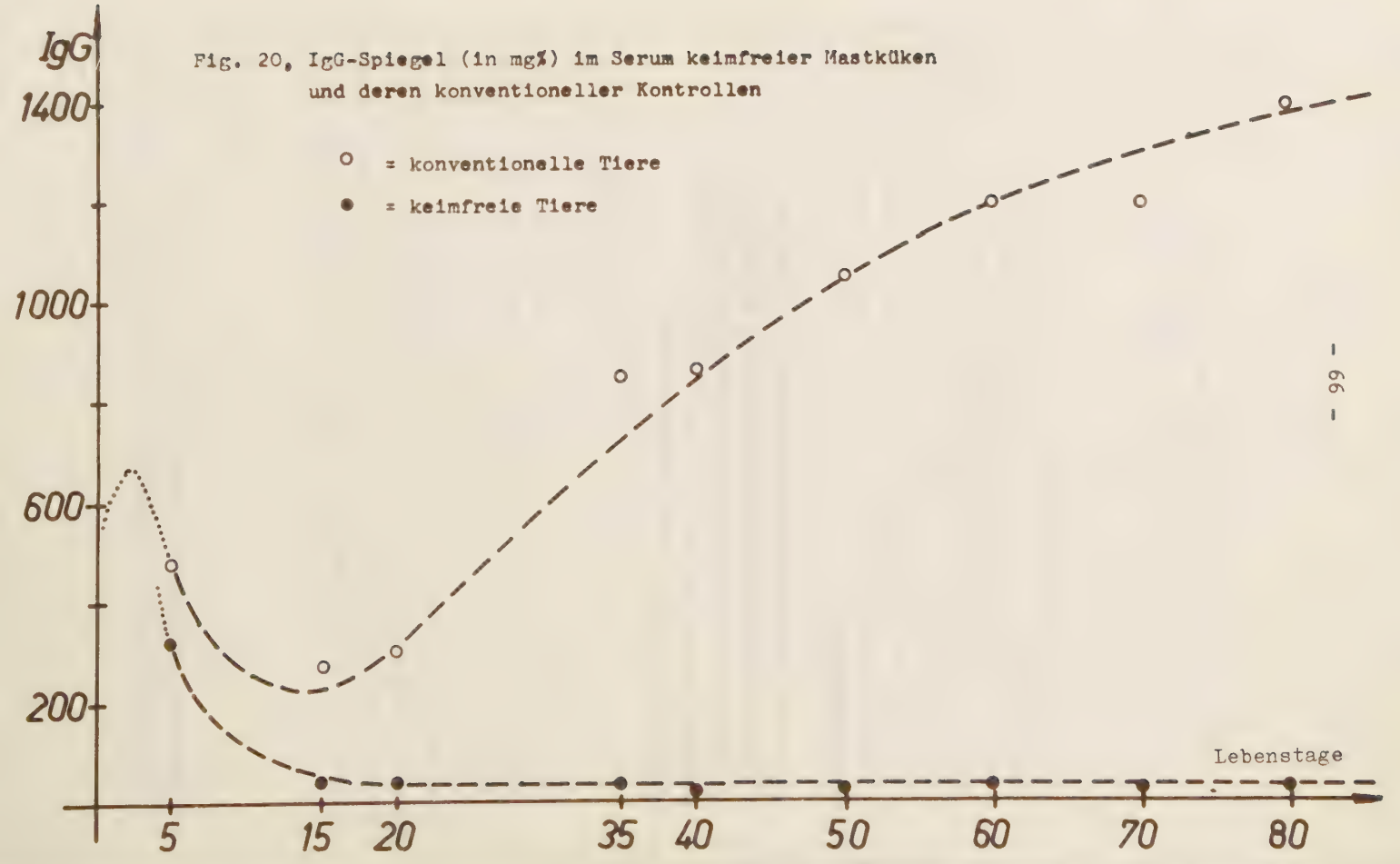


Fig. 20, IgG-Spiegel (in mg%) im Serum keimfreier Mastküken und deren konventioneller Kontrollen

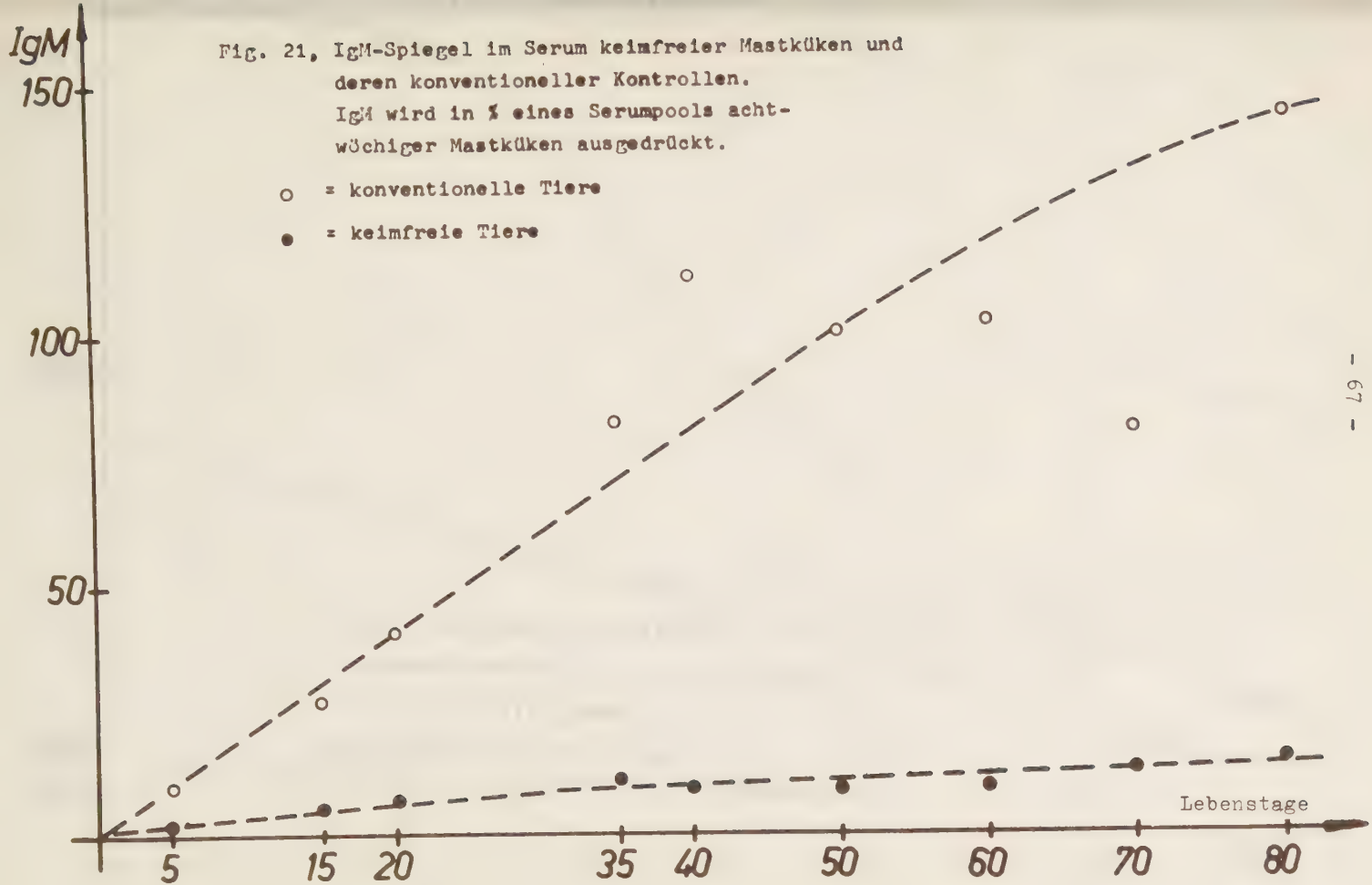
○ = konventionelle Tiere

● = keimfreie Tiere

Fig. 21, IgM-Spiegel im Serum keimfreier Mastküken und deren konventioneller Kontrollen.
IgM wird in % eines Serumpools achtwöchiger Mastküken ausgedrückt.

○ = konventionelle Tiere

● = keimfreie Tiere



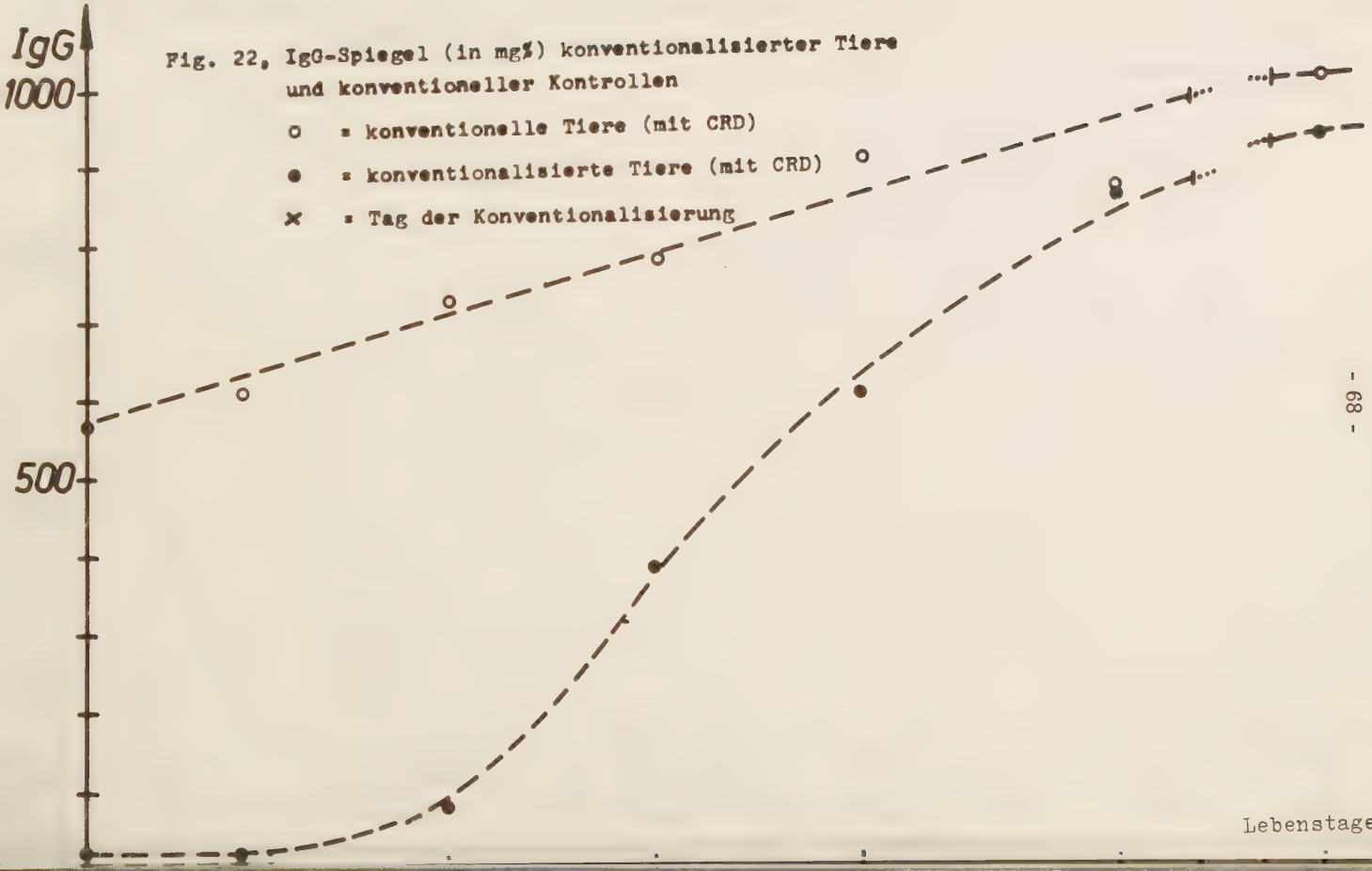


Fig. 22, IgG-Spiegel (in mg%) konventionalisierter Tiere und konventioneller Kontrollen

o = konventionelle Tiere (mit CRD)

● = konventionalisierte Tiere (mit CRD)

× = Tag der Konventionalisierung

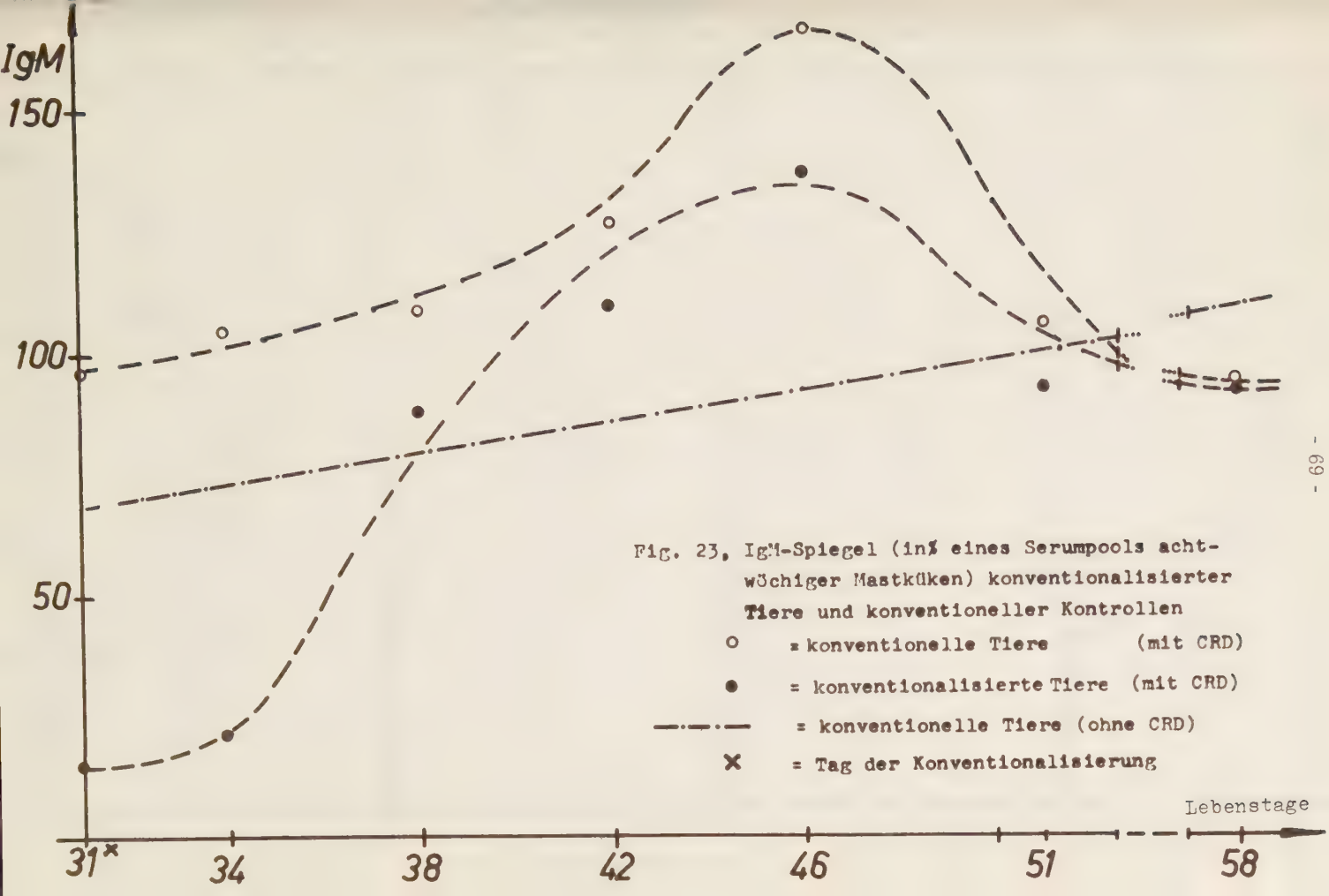


Fig. 23, IgM-Spiegel (in% eines Serumpools achtwöchiger Mastküken) konventionalisierter Tiere und konventioneller Kontrollen

○ = konventionelle Tiere (mit CRD)

● = konventionalisierte Tiere (mit CRD)

—·—·— = konventionelle Tiere (ohne CRD)

× = Tag der Konventionalisierung

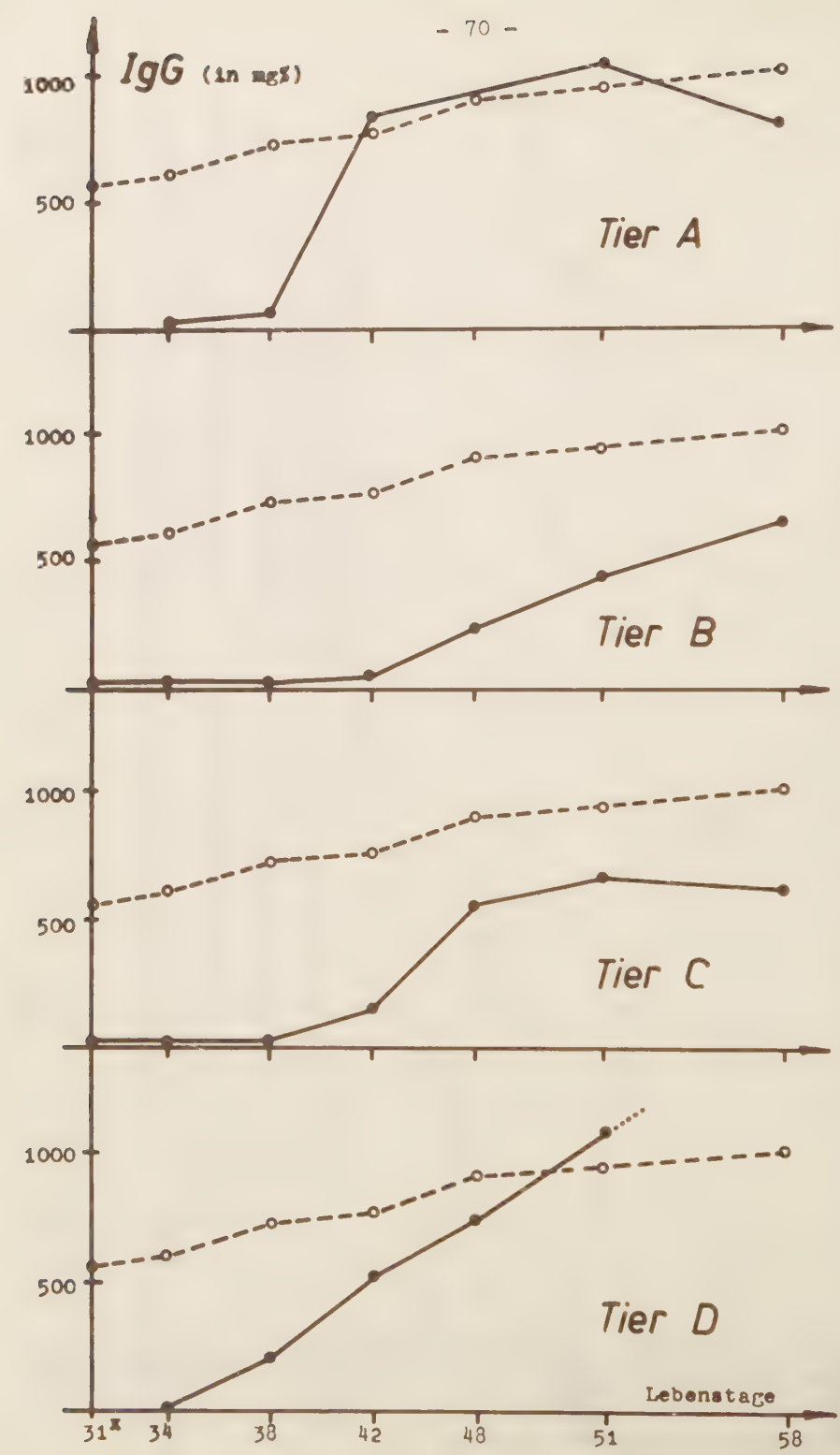


Fig. 24, IgG-Spiegel von Einzeltieren, verglichen mit Durchschnittswerten konventioneller Kontrolltiere. ● = konventionalisiertes Tier, ○ = Kontrolltier, x = Tag der Konventionalisierung

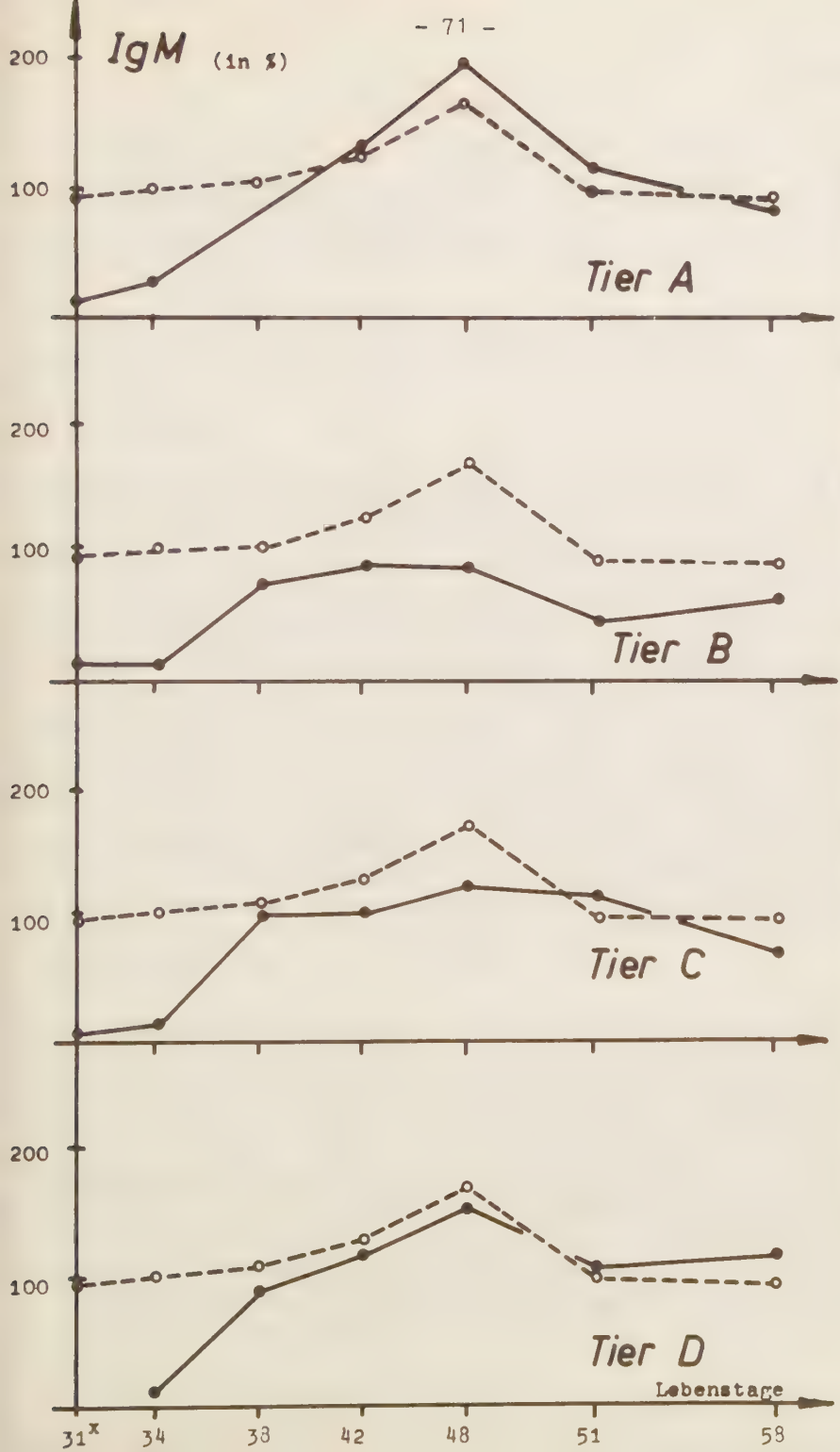


Fig.25, IgM-Spiegel von Einseltieren, verglichen mit Durchschnittswerten konventioneller Kontrolltiere. • = konventionalisiertes Tier, ○ = Kontrolltier, x = Tag der Konventionalisierung

Tabelle 16

Konventionalisierte Tiere

Alter in Tagen	Tge. nach Konvent.	Tier-zahl	IgG in mg%	s %	Tier-zahl	IgM in %	s %
31	0	5	29	± 35,7	7	15,0	± 30,5
34	3	6	32	± 24,6	6	21,7	± 41,5
38	7	7	74	± 84,0	6	88,0	± 12,8
42	11	8	378	± 68,7	8	110,0	± 14,7
46	15	7	618	± 37,8	8	137,0	± 26,2
51	20	8	875	± 34,2	8	92,0	± 44,2
58	27	8	940	± 35,7	8	94,0	± 30,8
			Konventionelle Tiere				
31	--	4	560	± 29,0	4	96,0	± 52,5
34	--	4	608	± 20,5	4	105,0	± 36,0
38	--	3	723	± 6,4	3	109,0	± 7,8
42	---	4	767	± 6,8	4	127,0	± 36,0
46	--	4	912	± 26,2	4	167,0	± 76,2
51	--	2	865	± 7,7	3	96,0	± 8,1
58	--	3	1015	± 38,9	3	92,0	± 34,6

Tabelle 16: Anstieg der IgG- und IgM-Spiegel nach der Konventionalisierung am 31. Lebenstag

Zu Tabelle 16:

IgG : Immunglobulin-G-Gehalt in mg %

IgM : Immunglobulin-M-Gehalt in Prozent eines Serumpools acht Wochen alter Tiere

s % : Individuelle Schwankung, berechnet über die Streuung s.

4.33 Diskussion

Bei konventionalisierten Küken soll der ansteigende Verlauf der IgG- und IgM-Spiegel mit dem Verlauf der Eigenproduktion von Immunglobulinen ab dem ersten Lebenstag konventioneller Tiere verglichen werden. In Tafel I sind die ermittelten IgG-Spiegel aus allen Versuchsreihen schematisch zusammengetragen. So können der Verlauf der IgG-Spiegel normaler Küken nach der Geburt und der keimfreier Küken nach dem Zeitpunkt der Konventionalisierung miteinander verglichen werden. Es fällt der wesentlich steilere Anstieg des IgG-Spiegels konventionalisierter Küken im Vergleich zur Endproduktion normaler Tiere auf. Diese Tatsache dürfte mit einer gewissen Stimulierung des peripheren lymphatischen Gewebes zu erklären sein, in dessen Plasmazellen ja die Immunglobulinproduktion stattfindet. Daß unter den vorliegenden Bedingungen der Keimfreihaltung ein minimaler Umweltreiz vorhanden ist, geht auch aus dem geringen Immunglobulinspiegel der keimfreien Küken hervor. Der steile Anstieg hält aber nur ca. 10 Tage an. Nach diesem Zeitpunkt ist offensichtlich die Kapazität der vorhandenen Zellen voll ausgelastet. Erst neue, auf die Reize der Konventionalisierung hin gebildete Immunglobulinbildner führen zur Erreichung des Normalspiegels.

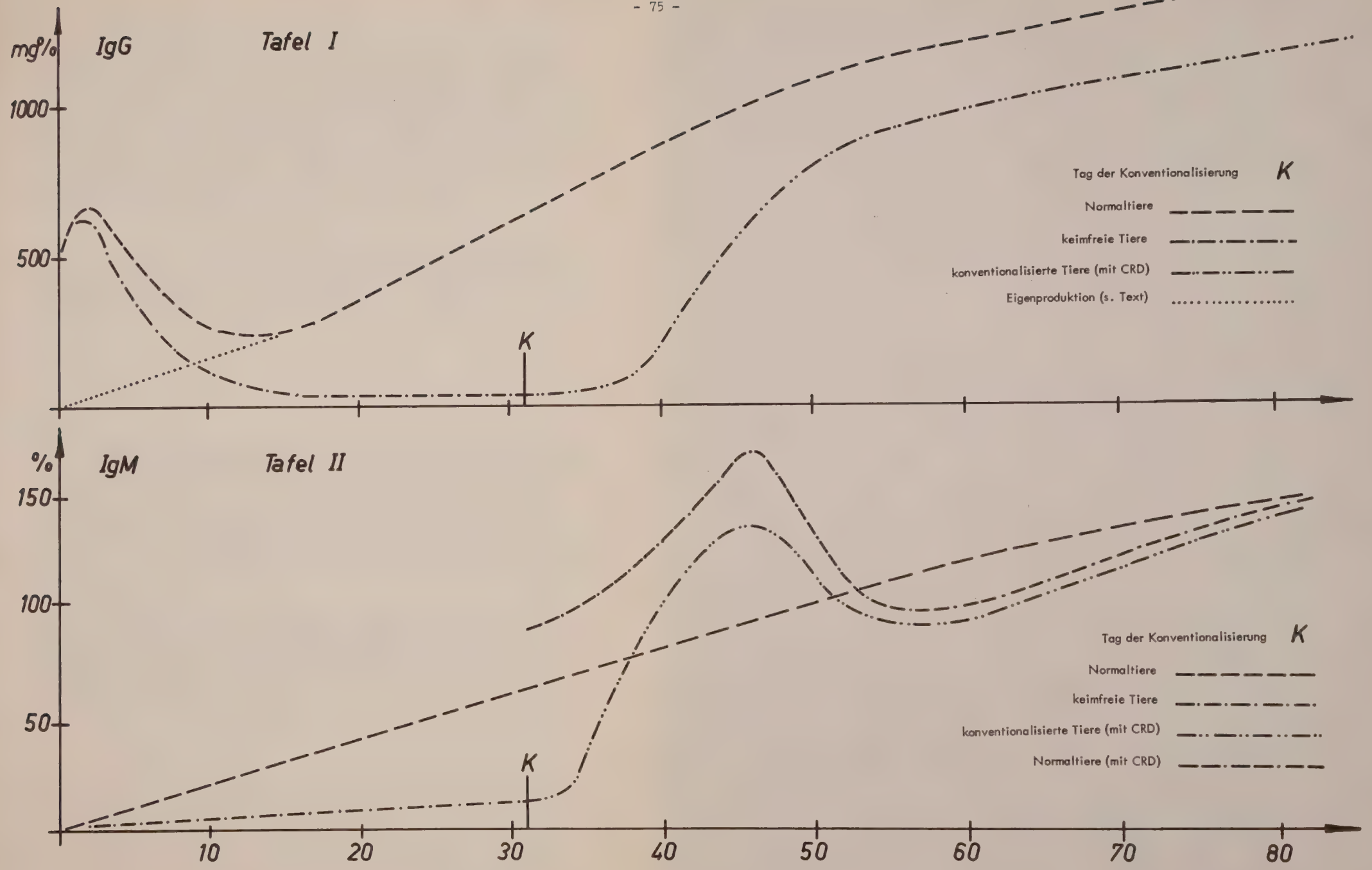
Der Einfluß einer stattgefundenen Mycoplasmeninfektion (CRD, diagnostiziert durch den Kleintiergesundheitsdienst des Institutes für Tierpathologie der Universität München) zum Zeitpunkt der Konventionalisierung dürfte sich auf die IgG-Spiegel nur unwesentlich auswirken. Die Kontrolltiere, die die gleiche Infektion überstanden, zeigen keine erkennbare Beeinflussung ihrer IgG-Spiegel.
Weiter ist in Tafel I die Eigenproduktion an IgG schematisch eingetragen. Im Normalfall sind diese Werte ca. bis zum 15. Tag vom mütterlichen IgG überlagert. Ihre Darstellung gelingt durch die IgG-Bestimmung bei Nachkommen dysgammaglobulinämischer Muttertiere, die kein IgG über den Dottersack erhalten (Lösch und Mitarbeiter (65, 73)).

Anders liegen die Verhältnisse beim IgM (Tafel II). Hier ist deutlich die Funktion des IgM als Primärantwort des immunbiologischen Abwehrsystems erkennbar. Der Einfluß der Mycoplasmeninfektion, auf die IgM-Spiegel der betroffenen Tiere, wird verdeutlicht durch die Überlagerung einer "Normalkurve" konventioneller Kontrolltiere, die nicht von der CRD betroffen waren.

Der Abfall der IgM-Spiegel der infizierten Tiere nach dem erreichten Gipfelwert unter den "Normalwert" deutet wieder auf eine Erschöpfung der die Immunglobuline bildenden Systeme hin, denn der antigene Reiz der Mycoplasmen war zu zu diesem Zeitpunkt noch vorhanden.

Durch die sehr hohen individuellen Schwankungen (s %) vorbereitet, überrascht es nicht, daß bei der Betrachtung von Kurven einzelner Tiere, das Tier A am 11. Tag bereits den IgG-Spiegel erwachsener Tiere erreicht hat, während das Tier B noch kaum einen Anstieg zeigt. Hier muß also prinzipiell der Begriff von "schlechten" und "guten" Immunglobulinbildnern eingeführt werden. Daß sich - zumindest bei den hier beschriebenen Untersuchungen - diese Eigenschaft nicht auf ein Immunglobulin, IgG oder IgM, beschränkt, zeigen die entsprechenden Vergleiche der Kurven bei Einzeltieren.

Mit aller Deutlichkeit soll aber festgestellt werden, daß bei den relativ geringen Versuchstierzahlen Schlüsse über die grundlegenden immunbiologischen Verhältnisse aus den gewonnenen Erfahrungen mit konventionalisierten Küken nicht gezogen werden können. Daß eine weitgehende Übereinstimmung der Verhältnisse nach der Geburt und nach der Konventionalisierung besteht, geht aus den vorliegenden Werten eindeutig hervor.


mg%
IgG
Tafel I
1000
500
K
Tag der Konventionalisierung K
Normaltiere
keimfreie Tiere
konventionalisierte Tiere (mit CRD)
Eigenproduktion (s. Text)
%
IgM
Tafel II
150
100
50
K
Tag der Konventionalisierung K
Normaltiere
keimfreie Tiere
konventionalisierte Tiere (mit CRD)
Normaltiere (mit CRD)
10
20
30
40
50
60
70
80

5. Zusammenfassung

Aus einer Übersicht über die Möglichkeiten zur spezifischen, quantitativen Immunglobulinbestimmung werden drei Verfahren ausgewählt und nach eigenen Versuchen beurteilt. Von der doppelten, zweidimensionalen Diffusion nach Ouchterlony und der einfachen, eindimensionalen Diffusion nach Oudin wird zugunsten einer Modifikation der von Mancini, Carbonara und Heremans ausführlich beschriebenen, einfachen, radialen Immundiffusion abgegangen. Die notwendigen Standardisierungsversuche werden durchgeführt und statistisch ausgewertet.

Mit der beschriebenen Bestimmungsmethode werden die Immunglobulinspiegel in den Seren normaler (konventioneller), keimfreier (gnotobiotischer) und dem keimfreien Milieu entnommener (konventionalisierter) Küken gemessen und die Ergebnisse diskutiert.

Summary

Three methods are chosen out of a review of the possibilities for specific immunglobulin-destination, and judged by own experiments. It is being deviated from the double, two-dimensional diffusion after Ouchterlony and the single, one-dimensional diffusion after Oudin in favour of a modification of the single, radial diffusion after Mancini, Carbonara and Heremans. The necessary experiments to standardize the method are performed and statistically analyzed.

The levels of immunglobulins in the sera of normal (conventional) and germfree (gnotobiotic) chickens and such ones out of the germfree milieu (conventionalized animals) are destinated with the described method, and the results discussed.

6. Literaturverzeichnis

1) Deutsch. H.F., J.C. Nichol and M. Cohn, J. Immunol. 63 (1949) 195

2) Banovitz, J., H.R. Wolfe, Precipitin Production in Chickens. The Components of Chicken Antiserum involved in the Precipitin Reaction, J. Immunol. 82 (1959) 489

3) Porter, R.R., The hydrolisis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain, Biochem. J. 73 (1959) 119

4) Edelman. G.M., J.F. Heremans, M.T. Heremans, H.G. Kunkel, Immunological studies of human gamma-globulin. Relation of the precipitin lines of whole gammaglobulin to those of the fragments produced by papain, J. Exp. Med. 112 (1960) 203

5) Cohen. S., R.R. Porter, Structura and biological activity of immunglobulins, Adv. in Immunology 4 (1964) 287

6) Tenenhouse, H.S., H.F. Deutsch, Some physical-chemical properties of chicken γ-globulins and their pepsin and papain digestion products. Immunochemnistry 3 (1966) 433

7) Gold, E.F., A A. Benedict, Comparison of polypeptide chains of γ-G-globulin from bursectomiced and normal chickens, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 (1967) 535

8) Gold, E.F., S. Cordes, M.A. Lopez, K.L. Knight and F. Haurowitz, Studies on chicken γ-Globulins and hapten-specific chicken antibodies, Immunochemnistry 3 (1966) 433

9) Benedict, A A., R. Brown, R.T. v. Hersh, Inactivation of high and low chicken antibodies by mercaptoethanol, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113 (1963) 136

10) Orlans. E., M.E. Rose, J.R. Marrack. Fowl Antibody: Some physical and immunochemical properties. Immunology 4 (1961) 262

11) Orlans, E., M.E. Rose, Fowl Antibody: The effect of normal fowl serum factors on specific precipitation and on haemolysis by fowl complement, Immunology 8 (1965) 193

12) Rosenquist, G. L., R.V. Gilden, Chicken antibodies to bovine serum albumin, Molecular size and sensitivity to 2-mercaptoethanol, Biochim. Biophys. Acta 78 (1963) 543

13) Franklin, E.C., Some physicochemical and biological properties of high molecular weight α-and β-globulins in chicken sera, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109 (1962) 338

14) Orlans, E., C.B. Richards, M.E. Rose, The composition of soluble complexes formed in antigen excess by fowl antibody to bovine gamma-globulin, Immunochemnistry 1 (1964) 317

15) Dreesman, G., A.A. Benedict, Properties of papain-digested chicken 7-S-Gammaglobulin, J. Immunol. 95 (1965) 855

16) Dreesman, G.R., A.A. Benedict, Reductive dissociation of chicken γ-G-immunoglobulin in neutral solvents without a dispersing agent, Proc. N.A.S. 54 (1965) 822

17) Pierce, A.E., R.G. Cubb, P.L. Long, The Significance of the Bursa of Fabricius in relation to the synthesis of 7 S and 19 S Immunoglobulins and Specific Antibody Activity in the fowl, Immunology 10 (1966) 321

18) Oberdorfer, A., (1968) persönliche Mitteilung

19) Kabat, E.A., in: Pappenheimer, A.M., The nature and significance of antibody response, p. 102, New York, Columbia University Press 1953

20) Coons, A.H., E.H. Leduc and J.M. Cormolly, Fed. Proc. 12 (1953) 439

21) Goodman, M., D.S. Ramsey, W.L. Simpson and M.J. Brennan, J. Lab. clin. Med. 49 (1957) 151

22) Pressman, D., Advanc. biol. med. Phys. 3 (1953) 99

23) Cohn, M., and A.M Pappenheimer, J. Immunol. 63 (1949) 291

24) Kun, L., Serologische Untersuchungsmethoden, in P. Baliut, Klinische Laboratoriumsdiagnostik, Bd. II, Berlin 1964, VEB Verl. Volk und Gesundheit

25) Dean, H.R., R.A Webb, The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction, J. Path. Bact., 29 (1926) 473

26) Ramon, G., A propos du titrage in vitro du sérum antidiphtérique par la flocculation, Compt. Rend. Soc. Biol. 86 (1922) 813

27) Kabat, E.A., M.M. Mayer, Experimental immunochemnistry, 2 nd ed. c.c. Thomas Puld, Springfield (1961)

28) Heidelberger, M., F.E. Kendall, A quantitative study of the precipition reaction between type III pneumoccoccus, polysaccarides and purified homologous antibody, J. Exp. Med. 50 (1929) 809

29) Boyden, A., S. Bolton, and D. Germeroy, Precipitin Testing with Special Reference to the Photoelectric Measurement of Turbidity, J. Immunol. 7 (1966) 186

30) Weiler, R.J., D. Hofstra, A. Szentivanyi, R. Blaisdell, D.W. Talmage, The Inhibition of Labeled Antigen Precipitation as a Measure of Serum γ -Globulin, J. Immunol. 85 (1960) 130

31) Tengerdy, R.P., Gammaglobulin Determination in Human Sera by the Inhibition of the Precipitation of Fluorescein-Labeled Gamma Globulin, J. lab. clin. Med. 65 (1965) 859

32) Hitzig, W.H., Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin, Springer Verlag (1963)

33) Ackroyd, J.F., Immunological Methods, (Symposium) Blackwell scientific publications, Oxford (1964)

34) Backhausz, R., Immundiffusion und Elektrophorese., VEB Fischer Verlag, Jena (1967)

35) Tiselius, A., The moving boundary method of studying of electrophoresis of proteins, Nova Acta Reg. Soc. Scient. Uppsal. 4 (1930) 7

36) Antweiler, H., Die quantitative Elektrophorese in der Medizin, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer Verlag (1952)

37) Labhart, H., H. Straub, Helv. chim. Acta 32 (1949) 1847

38) Grabar, P., C.A. Williams, Méthode permettant l`étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d`un mélange de protéins; application au sérum sanguin, Biochim. biophys. Acta (Amst) 10 (1953) 193

39) Scheidegger, J. J., Une microméthode de l`immuno-électrophorèse, Int. Arch. Allergy 7 (1955) 103

40) Laurell, C.B., Anal. Biochem. 15 (1966) 45

41) Laurell, C.B., Proc. 14 th Coll. Protides biol. Fluids, Brügge, 166 (1967) 499

42) Merril, D. Hartley and H.N Claman, J. Laborat. Clin. Med. St. Louis 69 (1957) 151

43) Backhausz, R., Immundiffusion und Elektrophorese, VEB Fischer Verlag, Jena (1967)

44) Ouchterlony, O., Acta Pathol. Mikrobiol. Scand. 25 (1948) 186

45) Darcy, D.A., Immunology 3 (1960) 325

46) Sharpless, N.S., G.A. LoGrippo, Henry Ford Hosp. Med. Bull. 13 (1965) 55

47) Gell, P.G H., The estimation of the individual human serum-proteins by an immunological method, J. Clin. Pathol. 10 (1957) 67

48) Hayward, B.J., and R. Augustin, Quantitative gel diffusion methods for assay of antigens and antibodies, Intern. Arch. Allergy 11 (1957) 192

49) Elek, S.D., Analysis of complex flocculating systems by means of diffusion gradients, Thesis, University of London (1948)

50) Jennings, R K. and F. Malone, Rapid double diffusion precipitin analysis. J. Immunol. 72 (1954) 411

51) Feinberg, J.G., Nature 177 (1956) 530

52) Oudin, J., Méthode d`analyse immunochimique par précipitation spécific en milieu gelifié, Compt. Rend. Acad. Sc. (1946) 115

53) Petri, G.G., A specific precipitin reaction associated with the growth on agar plates of Meningococcus, Pneumococcus and B. dysenteriae (Shiga), Brit. J. Exp. Path. 13 (1932) 380

54) Ouchterlony, O., In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphteria bacteria, Acta Pathol. Mikrobiol. Scand. 25 (1948) 186

55) Feinberg, J.G., Identification, discrimination and quantification in Ouchterlony gel plates, Int. Arch. Allergy 11 (1957) 129

56) Hayward, B.J., and R. Augustin. Quantitative gel diffusion methods for assay of antigens and antibodies, Int. Arch. Allergy 11 (1957) 192

57) Crowle, A.J., J. Lab. Clin. Med. 55 (1960) 593

58) Feinberg, J.G., J. Clin. Path. 16 (1963) 282

59) Feinberg, J.G., Nature, London 194 (1962) 307

60) Mancini, G., J.P. Vaerman, A.O. Carbonara, J.F. Heremans, Protides Biol. Fluids. 11 (1964) 370

61) Mancini. G., A.O. Carbonara, J.F. Heremans, Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion, Immunochemnistry 2 (1965) 235

62) Merkenschlager, M., U. Lösch, B. Kirchner, G. Riedel, und F. Gruber, Immunglobulingehalt im Serum junger, gnotobiotischer Mastküken, Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde, 22 (1967) 337

63) Horejsi, J., J.R. Smetana, Isolierung von Gammaglobulin aus dem Serum durch Rivanol (2-Aethoxy - 6,9 diaminoacridin lactat), Act. med. Scand. 155 (1956) 65

64) Kekwik, R.A., The serum proteins in multiple myclomatosis, Biochem. J. 34 (1940) 1248

65) Brüggemann, J., M. Merkenschlager, B. Kirchner und U. Lösch, Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn, Die Naturwissenschaften 4 (1967) 97

66) Fahey, J.L., E.M. McKelvey. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates, J. of Immunology 94 (1964) 84

67) Becker, W., W. Rapp, H.G Schwick, K. Störiko, Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation, Zeitschrift für Klinische Chemie und klinische Biochemie 3 (1968) 113

68) Fahey, J.L, F.W. Barth, The immunoglobulins of mice, serum immunoglobulin changes following birth, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119 (1965) 596

69) Brambell, R.F.W., The passive immunity of the young mammal Biol. Reviews 32 (1957) 488

70) Patterson, R., J.S. Youngs, W.O. Weigle, D.J. Dixon, The metabolism of serum proteins by the ovary of the hen, J. of gen. Physiol. 45 (1962) 501

71) Asofsky, R , A. Trnka, G.J. Thorbecke, Serum protein synthesis by embryonic and neonatal chicks, Proc. Soc. Exp. Biol. Med 111 (1962) 497

72) Merkenschlager, M., U. Lösch und G. Riedel, Die Ursache der mit der ersten Keimbesiedelung auftretenden Wachstumsdepressionen des Kükens, Tierärztliche Umschau 3 (1967) 132

73) Lösch, U., Mitarbeiter, Veröffentlichung in Vorbereitung

Am Ende meiner Arbeit möchte ich dem Vorstand des Institutes für Tierphysiologie, Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. Johannes Brüggemann, für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut danken.

Herrn Professor M. Merkenschlager und Herrn Dr. U. Lösch sei für die jederzeit großzügig gewährte Förderung bei der Durchführung der Arbeit an dieser Stelle nochmals mein besonderer Dank ausgesprochen.

Lebenslauf

Als drittes Kind des Bundesbahnbeamten Franz Gruber und dessen Ehefrau Therese, geb. Hoedl, wurde ich, Franz Gruber, am 27.11.1942 in Aschau/Chiemgau geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Aschau wechselte ich 1953 zur Oberrealschule Rosenheim über, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte.
Ab Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Universität München. Nach zwei Semestern Biologie und Chemie und acht Semestern Tiermedizin beendete ich im April 1968 mein tierärtzliches Staatsexamen. Zur Anfertigung meiner vorliegenden Dissertation arbeitete ich von Juni 1966 bis April 1968 im Institut für Tierphysiologie der Universität München.